

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE SANIDAD ANIMAL



TESIS DOCTORAL

Diversidad genética de la mitocondria intestinal de *Thorectes lusitanicus*

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Noemí Hernández Arranz

Directora

Mónica Suárez Rodríguez

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Sanidad Animal



DIVERSIDAD GENÉTICA DE LA MICROBIOTA INTESTINAL DE
Thorectes lusitanicus

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Noemi Hernández Arranz

Bajo la dirección de la doctora
Mónica Suárez Rodríguez

Madrid, mayo de 2014

La realización de este trabajo de investigación ha sido posible gracias a la financiación del Ministerio de Educación y Ciencia-INIA (Proyecto RTA 2005-00202-C02-02), Ministerio de Ciencia e Innovación (Proyectos “Thorbellota”: CGL2008/03878/BOS y “NiTerDist”: CGL2011-515 25544), cuyos Investigadores Responsables son la Dra. Mónica Suárez Rodríguez, el Dr. Jorge Miguel Lobo y el Dr. José Ramón Verdú Faraco, respectivamente.



D^a Mónica Suárez Rodríguez, Profesora Titular de Universidad del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral titulada **“Diversidad genética de la microbiota intestinal de *Thorectes lusitanicus*”**, que presenta la Licenciada en Bioquímica **D^a Noemi Hernández Arranz** ha sido realizada bajo ha sido realizada bajo mi dirección en el Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria, y estimamos que cumple todos los requisitos necesarios para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Madrid, a 8 de mayo de 2014

Fdo.: Dra. Mónica Suárez Rodríguez

“Cuando el mimo apunta al cielo, el tonto mira al dedo”
(Dicho popular)

A mi familia

INDICE

RESUMEN	1
---------	---

SUMMARY

3

INTRODUCCIÓN	5
--------------	---

1. CARACTERIZACIÓN DE <i>Thorectes lusitanicus</i> .	7
--	---

1.1. Descripción del ciclo de vida.	7
-------------------------------------	---

1.2. Interacción entre la etiología y la alimentación de <i>T. lusitanicus</i> .	8
--	---

1.3. Importancia ecológica de <i>T. lusitanicus</i> en la dispersión de bellotas del género <i>Quercus</i> .	10
--	----

1.4. Efecto del consumo de bellotas en la fisiología del escarabajo	12
---	----

2. ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD MICROBIANA.	15
--	----

2.1. Caracterización del gen <i>16S rARN</i>	16
--	----

2.1.1. Bases de datos del gen <i>16S rARN</i>	20
---	----

2.1.1.1. <i>Ribosomal Database Project</i>	20
--	----

2.1.1.2. <i>Greengenes</i>	20
----------------------------	----

2.1.1.3. <i>BLAST</i>	21
-----------------------	----

2.2. Técnicas de estudio de la microbiota intestinal.	21
---	----

2.2.1. Secuenciación Sanger.	22
------------------------------	----

2.2.2. Secuenciación automática en geles desnaturalizantes.	23
---	----

2.2.3. Pirosecuenciación.	24
---------------------------	----

2.2.4. <i>Microarray</i> .	25
----------------------------	----

2.2.5. Limitaciones de las técnicas descritas	26
---	----

3. CARACTERIZACIÓN DEL MICROBIOMA.	27
------------------------------------	----

3.1. Proyecto Microbioma Humano.	27
----------------------------------	----

3.1.1. Metagenómica.	31
----------------------	----

3.1.2. Adquisición de la microbiota y sus modificaciones en las diferentes	
--	--

etapas de desarrollo en el ser humano.	33
3.1.3. Cambios fisiológicos asociados a la microbiota.	34
3.1.3. Microbiota y fármacos: nuevos enfoques, nuevas funciones.	
35	
3.2. Otras microbiotas y microbiomas.	35
3.2.1. Transmisión maternal en vertebrados distintos al ser humano.	35
3.2.2. Ejemplos de otras microbiotas.	37
3.2.2.1. Mamíferos (oso panda gigante).	37
3.2.2.2. Aves (emú).	38
3.2.2.3. Peces (pez cebra).	40
3.2.2.4. Insectos.	41
3.3. Aplicaciones de la microbiota intestinal.	49
4. RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS.	51
4.1. Resistencia a antibióticos de la microbiota ambiental.	55
4.2. Resistencia intrínseca a antibióticos.	57
4.3. Resistencia adquirida.	58
4.3.1. Mecanismos de resistencia a antibióticos.	59
4.3.1.1. Transmisión horizontal de genes de resistencia.	60
4.3.1.2. Integrines.	62
4.3.1.3. Formación de biopelículas.	64
4.4. Resistencia antibiótica y microbiota intestinal.	65
OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN	67
TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN	71
Capítulo I	
Culturable aerobic, facultative anaerobic, and aerotolerant bacteria from the gut of the polyphagous dung beetle <i>Thorectes lusitanicus</i> Jeckel.	73
Capítulo II	
Effect of the diet on the diversity of the intestinal microbiota of the	

Capítulo III

The role of the dung beetle *Thorectes lusitanicus* (Coleoptera, Geotrupidae) as a potential vector of infectious diseases.

127

DISCUSIÓN	145
1. Diversidad genética de las bacterias cultivables.	148
2. Uso de las técnicas molecular para el estudio de la diversidad microbiana.	151
3. Funcionalidad de la microbiota intestinal de <i>T. lusitanicus</i> .	157
3.1. Función de la microbiota intestinal de <i>T. lusitanicus</i> en Sanidad Animal y Salud Pública.	158
3.1.1. Otras bacterias patógenas de la microbiota intestinal de <i>T. lusitanicus</i> .	161
3.2. Función en la biorremediación de la microbiota intestinal de <i>T. lusitanicus</i> .	162
3.3. Función fijadora del nitrógeno de la microbiota intestinal de <i>T. lusitanicus</i> .	167
3.4. Uso de los nutrientes que conforman la dieta.	168
3.5. Otros usos de interés para el ser humano.	169
CONCLUSIONES	171
BIBLIOGRAFÍA	175
INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA	213

RESUMEN

Thorectes lusitanicus es un escarabajo de la familia Geotrupidae (Coleopterae) endémico de la Sierra de los Alcornoques, Cádiz. Es diferente al resto de los escarabajos ibéricos de la misma familia ya que presenta un comportamiento polífago, siendo capaz de comer bellotas, hongos, frutas y heces de diferentes animales. Esta adaptación que le permite digerir un amplio rango de alimentos, da lugar a una serie de modificaciones y ventajas evolutivas que requieren cambios en la composición de la microbiota intestinal.

Para conocer la diversidad de la microbiota intestinal hemos usado dos técnicas de secuenciación del gen *16S rARN*: secuenciación Sanger y pirosecuenciación. Para ello, se estudiaron dos poblaciones distintas: escarabajos alimentados con bellotas y alimentados con heces.

Se aisló la microbiota aerobia, anaerobia y aerobia tolerante usando métodos tradicionales dentro del campo de la microbiología para poder obtener el ADN y secuenciar el gen *16S rARN*. Usando la base de datos BLAST y análisis filogenéticos de máxima similitud se determinó que los filos predominantes fueron Proteobacteria, Firmicutes y Actinobacteria. Dentro del filo de las Proteobacteria, el orden de las Enterobacteriales (clase Gammaproteobacteria) fue el más abundante. Las funciones más importantes asociadas al intestino de *T. lusitanicus* podrían ser la fijación de nitrógeno, detoxificación y la defensa contra patógenos.

Los resultados obtenidos de la pirosecuenciación del gen *16S rARN* indicaron que el filo mayoritario fue Proteobacteria (clase Gammaproteobacteria), que se compone de bacterias que van desde las que son anaerobias estrictas a sulforreductoras. Se observó que la mayoría eran bacterias entéricas y ambientales. Ocho géneros se compartían entre los escarabajos que tenían una dieta de bellotas y de heces (*Marmoricola*, *Bacilli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Hafnia*, *Kluyvera*, *Raoultella* y *Serratia*). En cambio, se encontraban géneros que eran exclusivos de una determinada dieta y no se compartían (bellotas: *Kocuria*, *Catellatospora*, *Hamadaea*, *Micromonospora*, *Mycobacterium*, y *Nakamurellaceae*; heces: *Demequina*, *Cellulomonas*, *Gordonia*, *Agrococcus*,

Arthrobacter y *Clavibacter*). Algunos de estos géneros podrían estar relacionados con la degradación de los diferentes componentes en el metabolismo de estos coleópteros como son la lignina, que forma parte del epicarpio de las bellotas, y la lignocelulosa, que es importante en la alimentación de los herbívoros. Estas bacterias podrían formar parte de los procesos metabólicos, pudiendo inhibir o creando rutas alternativas con el fin de obtener un beneficio mutuo. Comparando los resultados de ambas técnicas se observa que el filo mayoritario fueron las Gammaproteobacteria pero se había ingerencia en los datos. Esto puede ser ocasionado por la limitación de los métodos tradicionales de aislamiento, para aislar aquellas bacterias que no son cultivables.

Hay que destacar el papel importante de *T. lusitanicus* en la transferencia de enfermedades infecciosas, ya que son animales de vida libre y están en continuo contacto con otros animales tanto estabulados como salvajes. Un modo de transmisión de enfermedades son los vectores que, con frecuencia, son artrópodos que portan bacterias patógenas y que ayudan a la dispersión de las mismas. Además, hay que tener en cuenta que parte de estas bacterias poseen genes de resistencia a antibióticos por lo cual podrían estar relacionados con la resistencia adaptativa. Con las bacterias aisladas en el intestino, y que podría tener una potencial importancia desde el punto de vista médico y veterinario se realizaron perfiles de resistencia antibiótico, aquellos ampliamente usados en sanidad animal y humana. En nuestro caso, aislamos por primera vez en un escarabajo *Escherichia coli* O26: H11. De las cepas aisladas de la microbiota intestinal mostraron cierta resistencia *E. durans*, *E. silesiacus*, *E. amnigenus* y *P. oryzihabitants* a tetraciclina, amoxicilina-clavulánico y ampicilina, respectivamente. Estos resultados sugieren que *T. lusitanicus* podría considerarse un potencial transmisor de enfermedades infecciosas a mamíferos y podría condicionar la diseminación de resistencia a antibióticos.

SUMMARY

Thorectes lusitanicus is a beetle belonging to the family Geotrupidae (Coleopterae), typical of the Sierra de Alcornocales, Cadiz. Unlike other dung beetles, the Iberian geotrupid *Thorectes lusitanicus* exhibits polyphagous behavior; for example, it is able to eat acorns, fungi, fruits, and carrion in addition to the dung of different mammals. This adaptation to digest a wider diet has physiological and developmental advantages and requires key changes in the composition and diversity of the beetle's gut microbiota. Its interest lies in eating behavior as it is able to vary their diet alternating feces of herbivores on acorns, the only beetle capable. The dietary changes result also in changes in the microbiota of the intestine.

To know how diverse was the gut microbiota of *T. lusitanicus*, we use two different techniques of sequencing of the *16S rRNA* gene: Sanger and Pyrosequencing. Thus, we studied two different population: beetles fed with acorns and beetles fed with faeces.

The isolation of aerobic, facultative anaerobic, and aerotolerant microbiota amenable to grow in culture from the gut contents of *T. lusitanicus* and resolved isolate identity to the species level by sequencing *16S rRNA* gene fragments. Using BLAST similarity searches and maximum likelihood phylogenetic analyses, we were able to reveal that the analyzed fraction (culturable, aerobic, facultative anaerobic, and aerotolerant) of beetle gut microbiota is dominated by the phyla Proteobacteria, Firmicutes and Actinobacteria. Among Proteobacteria, members of the order Enterobacteriales (Gammaproteobacteria) were the most abundant. The main functions associated with the bacteria found in the gut of *T. lusitanicus* would likely include nitrogen fixation, denitrification, detoxification, and diverse defensive roles against pathogens. The results obtained with molecular techniques so far indicate that the edge Gammaproteobacteria majority is formed by bacteria of various features ranging from strict to be anaerobic sulforreductors. In order to increase the difference information of the intestinal microbiota diversity of *T. lusitanicus* we performed a 454-pyrosequencing analysis of *16S rRNA*. We showed that most of the detected bacteria were related to Enterobacteriaceae and environmental bacteria. 8 bacterial genera (*Marmoricola*, *Bacilli*,

Enterobacter, *Erwinia*, *Hafnia*, *Kluyvera*, *Raoultella*, *Serratia*) were common among the 2 different populations. In the gut of beetles being fed acorns, bacteria belonging to *Kocuria*, *Catellatospora*, *Hamadaea*, *Micromonospora*, *Mycobacterium*, and *Nakamurellaceae* types were detected. In the gut of beetles being fed faeces, *Demequina*, *Cellulomonas*, *Gordonia*, *Agrococcus*, *Arthrobacter*, and *Clavibacter* were detected. Some of these genera could be involved in the degradation of the different compounds during the metabolism of the diet in coleopterans such as the lignin, takes part in the shell of the acorns, and lignocellulose, a very important component in the diet of herbivorous mammals (a majority component of cellulose). Bacteria get involved in that process, their enzymes, could disrupt or branch metabolic pathways in terms to get a mutual profit between beetle and them. Both techniques' data evidenced that the majority phylum was Proteobacteria, class Gammaproteobacteria, but there was interference in datum. It could be created by the limitation of traditional methods of isolation to isolate these non-culturable bacteria.

The importance of the beetles depends on their interactions with the environment and the other animals (livestock and wild animals). Control measures in disease transmission should be followed in order to reduce the frequency of diseases affecting livestock. With the isolated strains from the gut of the beetle that could be potentially important from a medical and veterinary point of view we determined the resistance profiles to antibiotics. We performed this study with antibiotics widely used in human and veterinary health. In addition, the enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26: H11 strain was isolated for the first time from this beetle. Four of the isolated strains showed some level of antibiotic resistance. *E. durans*, *E. silesiacus*, *E. amnigenus* and *P. oryzihabitans* were resistant to tetracycline, amoxicillin-clavulanate and ampicillin, respectively. These results suggest that *T. lusitanicus* could be considered as a potential transmitter of infectious diseases to mammals, and also as a dissemination factor for antibiotic resistance.

INTRODUCCIÓN

1. CARACTERIZACIÓN DE *Thorectes lusitanicus*.

1.1. Descripción del ciclo de vida.

Thorectes lusitanicus (Scarabaeoidea, Geotrupidae) es un escarabajo endémico del sur de la Península Ibérica que no posee alas (Martín-Piera y López-Colón, 2000). Según Klemperer y Lumaret (1985) el ciclo vital del escarabajo comienza con la oviposición, que tiene lugar entre los meses de septiembre y noviembre. Los huevos se localizan dentro de la masa del excremento, donde permanecen de 11 a 14 días. El primer estadio larvario se prolonga de 11 a 15 días, el segundo de 14 a 19 días y el tercero de 4 a 5 meses. Los adultos (Fig. 1) emergen en primavera, entre abril y mayo (López-Colón y Pérez, 2010), indicando que el ciclo biológico puede variar bastante según las condiciones climáticas locales, alargándose en zonas de mayor altitud o, por el contrario, acelerándose en poblaciones litorales y en regiones con climas más suaves.



Figura 1: *T. lusitanicus* sobre un lecho vegetal en condiciones laborales (imagen perteneciente a N. Hernández).

Los escarabajos de la familia Geotrupidae están distribuidos principalmente en la región Holoártica. Según Howden (1955) todas las especies que se encuentran dentro de la familia son monofiléticas. Este dato fue corroborado por Verdú *et al.* (2004) que realizó estudios de las diferentes características estructurales entre más de 30

individuos de la subfamilia, pertenecientes a 22 géneros (un total de 44 especies), aplicando en estudios evolutivos las teorías de la parsimonia y los análisis Bayesianos. Por lo tanto, los resultados de estos análisis pusieron de manifiesto que la familia Geotrupidae es un grupo monofilético.

1.2. Interacción entre la etiología y la alimentación de *T. lusitanicus*.

La tendencia a la coprafagia un rasgo característico de la mayoría de los escarabajos y en la familia Geotrupidae. En los géneros de los Geotrupidae más primitivos, *Odonteus* y *Bolbelasmus*, la alimentación se basa principalmente en el humus y hongos, aunque son coprófagos. Esto se observa en la modificación que tiene en las partes de la boca, en especial en el caso de los estadios adultos (Halffter y Matthews, 1961; Cambefort, 1991). Además, las especies más primitivas usan las heces para la puesta de los huevos, hábito que no se refleja en el caso de los géneros más modernos, como es el caso de *Thorectes*, que usan las heces básicamente como alimento (Verdú *et al.*, 2004).

T. lusitanicus es un escarabajo paleoártico, y como tal, consume preferentemente heces de herbívoros, omnívoros, y ocasionalmente, de carnívoros (Martín-Piera y Lobo, 1996). Normalmente son generalistas, aunque existen especies que prefieren un determinado tipo de heces sobre otra. Aparte de su coprofagia como patrón general, se han descrito hábitos necrófagos, saprófagos e incluso micetófagos en la variante norteafricana *T. laevigatus* (Palestrini y Zunino, 1985). Según las observaciones de Martín-Piera y López Colón, esta especie se desarrolla principalmente en los excrementos de ganado ovino y caprino, así como en los de herbívoros silvestres y los cúmulos de bolitas de conejo, pero también consume las deyecciones del ganado vacuno y, más raramente, las de los equinos, las heces, de equinos, humanas y de jabalíes.

En el caso de *T. lusitanicus*, Verdú *et al.* (2009) han descrito que poseen estos escarabajos una gran atracción por las bellotas de *Quercus suber* y *Quercus canariensis* (Fig. 2). A pesar de esta característica, necesitan gran cantidad de alimento para poder

establecer su nido y consecuentemente construir su población. Con respecto a la nidificación, las hembras producen la puesta de los huevos en las heces y allí permanecen hasta la eclosión y la posterior salida de la larva que encuentra alimento en las heces.



Figura 2: Esquemas pictóricos de *Quercus suber* (i) y *Quercus canariensis* (ii). En ellos se observan las diferencias a nivel morfológico de ambos árboles, así como diferencias en el tamaño de las bellotas (imágenes pertenecientes a la web de la Junta de Andalucía).

T. lusitanicus posee fuertes mandíbulas para poder romper la dura testa de la bellota y, probablemente, unas enzimas digestivas muy particulares capaces de procesar este tipo de alimento, tan diferente del habitual en la comunidad de escarabajos peloteros. Normalmente, cuando *Thorectes* encuentra una bellota, se entierra con ella unos pocos centímetros bajo tierra y permanece ahí durante semanas, protegida en muchas ocasiones dentro del duro pericarpio de la semilla. Además, durante el lento proceso de roedura del cotiledón, algunas de estas bellotas enterradas pueden ser abandonadas, cuando aún están parcialmente consumidas o incluso intactas. En estos casos, si el embrión no ha sido dañado, podría ocurrir la emergencia satisfactoria de plántulas, de manera que el escarabajo ejercería un importante papel como dispersor secundario de bellotas.

1.3. Importancia ecológica de *T. lusitanicus* en la dispersión de bellotas del género *Quercus*.

La regeneración de los bosques de plantas leñosas depende de la supervivencia de las semillas y la capacidad de dispersión de las mismas en el espacio y en el tiempo (Fig. 3).

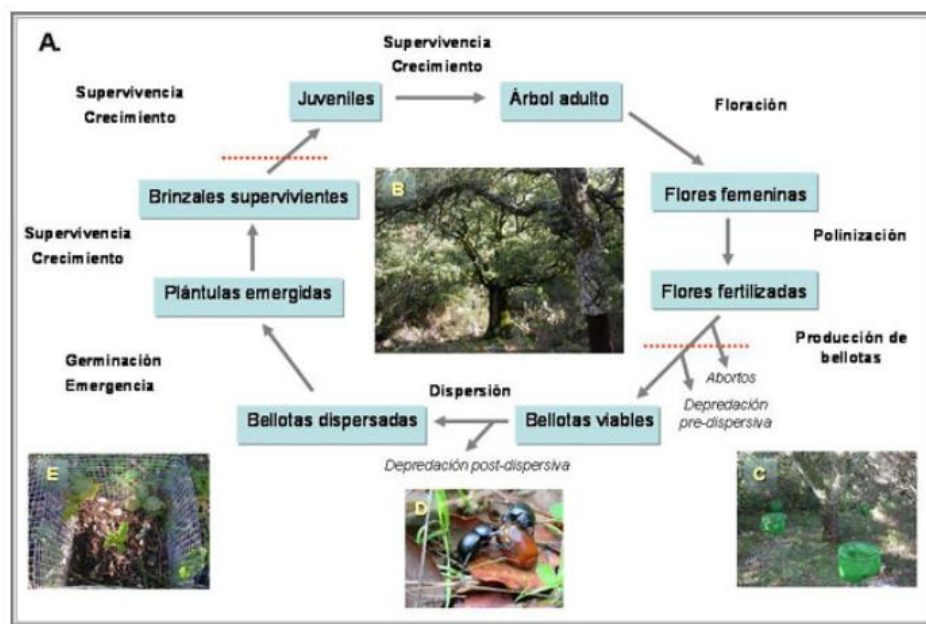


Figura 3: Implicación de *T. lusitanicus* en el ciclo de dispersión de las bellotas (imagen extraída de Pérez-Ramos, 2007).

Por lo tanto, la regeneración de bosques de quercíneas está determinada por diferentes tipos de factores: los factores ambientales (entre los que destacan la competencia entre plántula), la distancia al adulto más cercano, la disponibilidad hídrica, la intensidad lumínica y una serie de parámetros edafológicos (fertilidad y acidez del suelo, espesor de la capa de hojarasca), factores humanos (prácticas de rozas y aclareos de matorral), y la acción depredadora post-dispersiva, especialmente por parte de pequeños roedores.

En el caso de las plantas de la familia *Quercus*, las bellotas poseen un alto valor nutritivo (Tabla 1), por lo que las hace muy atractivas a los mamíferos herbívoros que viven en los bosques de *Quercus*. En el caso de *Q. suber* y *Q. canariensis* las bellotas son de gran tamaño, por lo que la dispersión depende los animales que van a ingerirlas.

Los métodos de dispersión de las semillas dependen de factores como son el viento, el agua, los animales o incluso en el caso de algunas especies vegetales, de la autodispersión que consiste en la existencia de cápsulas explosivas que lanzan las semillas a cierta distancia. Existen especies de árboles cuyos frutos carnosos, que sirven de alimento a los animales y son digeridas y expulsadas con las deposiciones de estos animales. Así, las semillas se van dispersando por los diferentes hábitats. Un ejemplo es el olivo cuyo fruto necesita ser previamente digerido por un animal para que tenga lugar la germinación de la semilla.

Las plántulas del género *Quercus* necesitan ser transportadas a cierta distancia y enterradas en la tierra para poder germinar. Se consideran como plantas leñosas cuyos patrones de regeneración son poco eficientes si se comparan con otras como el *Viburnum tinus* (Pérez-Ramos, 2007). La emergencia se ve limitada por determinadas características como son la existencia de depredadores de bellotas y a otros problemas relativos a la saturación de agua del suelo. Por ello, se estima que tan sólo entre el 0,15 y el 0,98% de las semillas producidas han dado lugar a una plántula de dos años de *Q. canariensis*, mientras que entre el 0,025 y el 1,14% llegaron a esta misma fase en el caso de *Q. suber*. En ambas especies, los sitios más aptos para la regeneración fueron aquéllos localizados debajo del árbol, pero en aquellos lugares sin matorral denso.

Sin embargo, recientemente se ha determinado que la acción post-dispersiva del escarabajo coprófago *T. lusitanicus* puede ejercer una influencia positiva en la regeneración de bosques de *Quercus* (Pérez-Ramos *et al.*, 2007; Verdú *et al.*, 2007). Se han estudiado las poblaciones de *Q. suber* (alcornoque) y *Q. canariensis* (quejigo) existentes en el Parque Natural de “Los Alcornocales” (Cádiz-Málaga) (Fig. 4). Este escarabajo coprófago cambia su dieta en otoño para alimentarse de bellotas que encuentra en el suelo, consumiendo parte de las mismas de forma que continúan siendo viables cuando el coleóptero las entierra o las desplaza a distancias relativamente largas de su posición original (Pérez-Ramos, 2007). Se ha determinado experimentalmente que este escarabajo es capaz de manipular aproximadamente un 40% de las bellotas expuestas en ciertos micrositios (Pérez-Ramos *et al.*, 2007), aumentando en gran proporción las posibilidades de dispersión de las semillas. En estudios experimentales, *T. lusitanicus* ha sido expuesto a dos tipos de bellotas simultáneamente, determinándose

que no existe ningún tipo de preferencia alimenticia entre ambas especies de *Quercus* (Pérez-Ramos *et al.*, 2007). Las diferencias encontradas se deben posiblemente a la precocidad de *Q. canariensis* respecto a *Q. suber*, coincidiendo con el momento de máxima actividad de los escarabajos, lo que motiva que las tasas de manipulación de las bellotas registradas para el quejigo sean mayores que para el alcornoque.

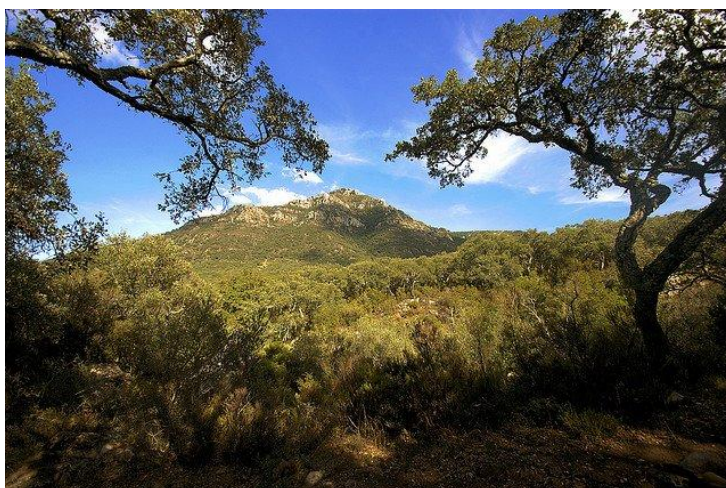


Figura 4: Parque Natural de Los Alcornocales en la provincia de Cádiz. Se observan árboles del género *Quercus* (imagen perteneciente a la web www.diariodelviajero.com)

1.4. Efecto del consumo de bellotas en la fisiología del escarabajo.

La bellota entera es un alimento altamente energético, como se detalla en la Tabla 1, su fracción lipídica es de gran valor nutritivo y elevado grado de insaturación: 62% ácido oleico y 16% ácido linoleico. Sus principales componentes son almidón y azúcares (glucosa y sacarosa), fibra bastante lignificada (el 30% del peso del fruto corresponde a la cáscara) con presencia de taninos. Asimismo tiene un contenido apreciable en gamma-tocoferol y un elevado porcentaje de humedad (40%). Es un alimento deficitario en la proteína que se encuentra fundamentalmente ligada a la pared celular.

Tabla 1: Composición media de la pulpa de la bellota y comparación entre especies del género *Quercus* (modificada de Rodríguez-Estévez *et al.*, 2008)

Composición de la pulpa de la bellota de <i>Q. suber</i>		Composición de la pulpa de la bellota de <i>Q. ilex</i>	
Proteína bruta	7,0	Proteína bruta	5,0
Grasa bruta	7,7	Grasa bruta	7,0
Fibra bruta	1,8	Fibra bruta	3,2
Cenizas	2,0	Cenizas	2,0
Calcio	0,14	Calcio	0,24
Fósforo	0,12	Fósforo	0,08
Magnesio	0,06	Magnesio	0,07
Hierro	2,56	Hierro	2,71
Cobre	2,79	Cobre	2,2
		Ácidos Grasos (g/100g ácidos grasos)	
		C12:0	-
		C14:0	0,1
		C15:0	0,1
		C16:0	12,6
		C16:10.1n-9	-
		C16:1n-7	0,1
		C17:0	0,1
		C17:1	-
		C18:0	3,6
		C18:1n-9	62,9
		C18:1n-7	-
		C18:2n-6	17,7
		C18:3n-3	1,1
		C20:0	0,3
		C20:1n-9	-
		C20:2n-6	-
		C20:4n-6	-
		SELN	81,0
		Gamma-tocoferol	-
		Alfa-tocoferol	-

Puesto que la mayor parte de los glúcidos y lípidos se encuentran en la pulpa y la cáscara presenta una mayor proporción de taninos y lignina (Rodríguez-Estévez *et al.*, 2008). Los efectos sobre *T. lusitanicus* dependerán en gran medida de la limitación del consumo de la semilla en su porción externa y/o en el interior de la misma correspondiente al epicarpio.

Se han estudiado los efectos de este tipo de alimentación sobre el desarrollo de los escarabajos, y se ha encontrado que los animales alimentados con bellotas son 4,6 veces más pesados que aquéllos alimentados con excrementos. La cantidad de proteína presente en su hemolinfa es 4,5 veces mayor, lo cual se relaciona con un descenso de 5°C en el punto de congelación de estos animales, y un incremento de 0,23°C en su actividad termal (Verdú *et al.*, 2009). Estos parámetros están directamente relacionados

con la supervivencia del animal en la hibernación. Asimismo se intuye que estas características también tienen una influencia directa sobre la regulación de la temperatura corporal, que en escarabajos coprófagos se eleva mediante temblores en los músculos del vuelo (atrofiados en *Thorectes*).

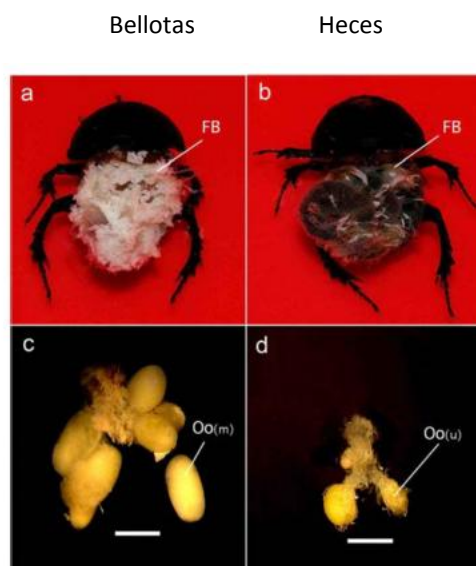


Figura 5: Diferencias fisiológicas asociadas a la dieta de *T. lusitanicus*. En a y b se observa el desarrollo del cuerpo graso del escarabajo, pudiendo ver que aquellos que se alimentan sólo de bellotas tienen un mayor desarrollo del mismo. En el caso del tamaño de los ovarios en las hembras (c y d) se observa también un mayor tamaño y, por lo tanto, mayor peso ovárico (imagen perteneciente a Verdú *et al.*, 2009).

La hemolinfa de los escarabajos alimentados con bellotas presenta un nivel entre 2 y 3 veces mayor de ácidos grasos insaturados, según la variedad, determinándose que los ácidos esteáricos y linolénico se encontraron exclusivamente en escarabajos alimentados con bellotas. Este dato es importante puesto que la deficiencia de estos compuestos impide el correcto desarrollo de las diferentes fases del insecto. Podemos concluir que el consumo de bellotas mejora la salud de los escarabajos del género *Thorectes*, no sólo dotándoles de mayor capacidad de supervivencia, sino teniendo además un efecto directo sobre la función reproductiva (mayor peso ovárico, mayor número de oocitos por ovario y mayor peso medio de los oocitos) y, por lo tanto, un mayor éxito en la reproducción (Verdú *et al.*, 2009).

2. ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD MICROBIANA.

El término diversidad microbiana, describe el número de especies de microorganismos diferentes y su abundancia relativa en una comunidad determinada en un hábitat dado (Garvega *et al.*, 2004).

Se ha sugerido que el 99% de las bacterias observadas bajo el microscopio no son cultivables por las técnicas comunes de laboratorio (Torsvik *et al.*, 1998). La mayoría de la diversidad global es inaccesible por los métodos dependientes de cultivos, por lo que se piensa que sólo se conoce en torno al 1% de las bacterias que habitan en la biosfera (Giovannoni y Stingk, 2005). Se puede suponer que ese 1% es representativo de la población entera y que el 99% es simplemente un estado fisiológico que evita que las bacterias sean cultivadas en los medios actuales, o que es posible que el 99% sean fenotípicamente y genéticamente diferentes y solo la minoría de la población está representada (Michelle *et al.*, 1999). Para vencer el obstáculo de la dependencia de cultivo, se han desarrollado varios métodos para identificar y estudiar más microorganismos, como son el análisis de ácidos grasos y métodos basados en variaciones de la PCR (*Polymerase Chain Reaction*, Reacción en Cadena de la Polimerasa) para analizar tanto ADN (Ácido Desoxirribonucleico) como ARN (Ácido Ribonucleico) (Kirk *et al.*, 2004).

El desarrollo de métodos que son independientes de cultivo (Tabla 2) y la comercialización de nuevas generaciones de secuenciación han creado nuevas expectativas, ya que las técnicas nuevas aumentan la productividad debido al ahorro de tiempo invertido y a la gran capacidad para producir datos. De este modo, se han podido caracterizar muchas comunidades en diferentes ambientes que van desde los sistemas vivos como el intestino a los inertes como el suelo (Roesch *et al.*, 2007). Gracias a estos nuevos métodos, los sistemas pueden caracterizar estas comunidades en cuanto a la estructura, el metabolismo y la función que desempeñan.

Tabla 2. Descripción de algunas técnicas para estudiar la diversidad microbiana.

Método	Ventaja	Desventaja	Referencia
Recuento en placa	Rápido y barato	No detecta los organismos no cultivables. Sesgo entre aquellos que crecen más rápido.	Tabacchioni <i>et al. al.</i> (2000)
Perfil fisiológico a nivel de comunidad (CLPP)	Rápido, reproducible, barato. Diferencia entre las comunidades microbianas. Genera gran cantidad de datos	No detecta los organismos no cultivables. Sesgo a organismos que crecen rápido Sólo representa aquellos organismos capaces de usar fuentes de carbono disponibles. Depende de la cantidad de inóculo	Garland y Mills. (1991) Yao <i>et al.</i> (2000)
Análisis de ácidos grasos metil ester (FAME)	No depende de cultivo. Extracción directa de la muestra a trabajar Sigue organismos específicos	Puede ser influenciado por factores externos. Los resultados de distintos organismos pueden ser confundidos	Siciliano y Germida (1998) Bhat (2000) Graham <i>et al.</i> (1995)

2.1. Caracterización del gen *16S rARN*.

A mediados de los años 80 se produjeron grandes avances en la tipificación de las bacterias y en la caracterización de las relaciones filogenéticas, en los que se usaron nuevas aproximaciones basadas en el tamaño completo de los genes ribosomales (Woose, 1987). Se describieron tales genes como “relojes moleculares”, debido a su universalidad, su actividad en las funciones celulares, y la estructura y secuencia de sus nucleótidos ampliamente conservada.

Existen tres tipos de rARNs procarióticos que se definen por su grado Sverberg o S, refiriéndose a la ratio de sedimentación y son 5S, 16S y 23S cuyas secuencias poseen 120, 1550 y 3300 nucleótidos, aproximadamente (Rossello-Mora y Amann, 2001). Tras varias experiencias para poner a punto la secuenciación, se llegó a la conclusión que la secuencia del 5S era demasiado corta y la del 23S, demasiado larga, lo cual limitaba la posibilidad de poder caracterizar taxonómicamente las bacterias.

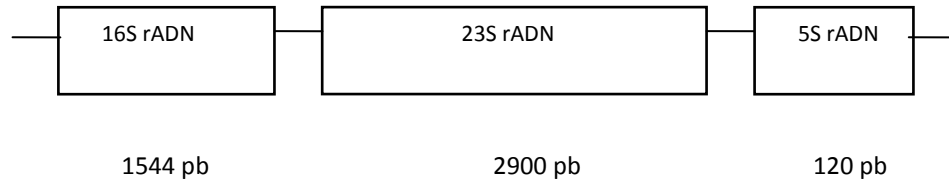


Figura 6: Representación esquemática de los genes 16S rADN, 23S rADN y 5S rADN de la bacteria *Vibrio cholerae* (modificado de Huguet *et al.*, 2000).

Por ello, el gen *16S rARN*, es el gen que se analiza en estos métodos, ya que tiene la ventaja de dar información sobre la clasificación taxonómica sin requerir aislamiento ni cultivo. Forma parte de la subunidad inferior del ribosoma procariótico y consiste en 9 regiones altamente conservadas (C1-C9) y 9 regiones variables a lo largo del dominio (V1-V9) (Fig. 7).

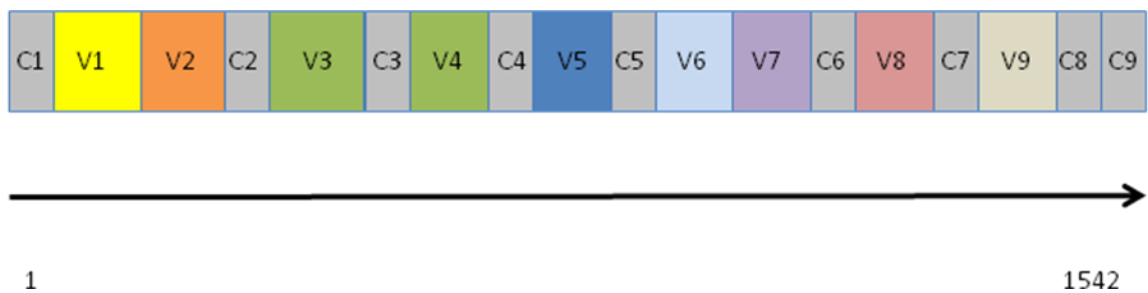


Figura 7: Estructura del gen *16S rARN* (modificada de Petrosino *et al.*, 2009). Se observa que la longitud del gen es de 1542 pares de bases divididas en segmentos variables y conservados.

Además, no suele existir transferencia lateral de genes, estando la estructura formada por genes conservados y variables con diferentes *ratios* de evolución. La relación entre los diferentes genes *16S rARN* refleja la relación evolutiva entre los organismos.

Una vez determinada la secuencia de nucleótidos y establecidas las comparaciones, será el grado de similitud entre las secuencias de los *16SrARN* de dos bacterias lo que indique su relación evolutiva. Hay que tener en cuenta, no obstante, que es la comparación de genomas completos, y no la comparación del *16SrARN*, la que aporta una indicación exacta de las relaciones evolutivas. En su ausencia, la especie bacteriana se define, en taxonomía, como el conjunto de cepas que comparten una

similitud del 70% o más, en experimentos de reasociación ADN-ADN. Stackebrandt y Goebel demostraron que cepas con este nivel de relación presentan típicamente una identidad del 97% o más entre sus genes *16SrARN*. Así, cepas con menos del 97% de identidad en las secuencias es improbable que lleguen a estar relacionadas a nivel de especie. Sin embargo, existen cepas que comparten una similitud inferior al 50% en experimentos de reasociación, y son, por tanto, clasificadas en especies diferentes, pero presentan una identidad del 99-100% a nivel de *16S rARN*. Por ello, en taxonomía, actualmente se recomienda la identificación polifásica, que utiliza tanto criterios fenotípicos como datos de secuenciación (Stackebrandt *et al.*, 2002). En microbiología clínica, esto implica que la secuenciación del gen *16S rARN* no aportará siempre una identificación definitiva a nivel de especie (Gianoulis, 2008).

La medida de la diversidad microbiana en el medio ambiente engloba dos aspectos, la riqueza que es el número de especies presentes en una muestra y la distribución de la abundancia relativa de especies (Magurran, 2005). Para poder determinar la riqueza de especies respecto a la medida del gen *16S rARN* se asignan las secuencias dentro de OTUs (Operational Taxonomic Units, unidades taxonómicas operacionales). El total de la diversidad en una muestra se puede representar por medio de curvas de rarefacción que miden el número acumulado de OTUs o filotipos capturados en una muestra determinada (Eckburg *et al.*, 2005). Para el estudio de la diversidad existen diferentes métodos que pueden ser paramétricos o no paramétricos. En el caso de los no paramétricos, se usan estimadores de la riqueza, como es el Chao1. En el de los paramétricos se usan estimadores como el de Shannon. Ambos métodos miden la uniformidad de la diversidad y se diferencian en que Chao1 se basa en la medida de la abundancia total, y mientras que el índice de Shannon refleja la heterogeneidad de una comunidad sobre la base de dos factores: el número de especies presentes y su abundancia relativa.

La amplificación por medio de PCR del gen *16S rARN* de organismos nos da una aproximación de la estructura de una comunidad, en especial en el caso de las bacterias no cultivables, ya que es imposible reproducir las condiciones en el laboratorio. Por ello, se diseñan una serie de oligonucleótidos o *primers* que pueden ser específicos de taxón

o bien útiles para identificar procariotas, a los cuales se les denomina “universales”. Curiosamente, mediante este sistema, se han descubierto nuevas subdivisiones dentro del dominio *Arquea*, los *Corarqueotas* y los *Nanoarqueotas* (Huber *et al.*, 2002).

En el diseño de los *primers* éstos deben realizarse de tal manera que deben ser complementarios a las regiones conservadas de los genes a analizar. Además, deben presentar las siguientes características: complementariedad *primer/primer*, temperatura de anillamiento correcta y una *ratio* %GC en torno al 40-50% (McPherson *et al.*, 1995).

2.1.1. Caracterización del gen 16S rARN.

Podríamos caracterizar el gen 16S rARN según Woese (1987), de acuerdo con los siguientes criterios:

- 1.- Es una molécula muy conservada que se encuentra en todas las bacterias. Es una diana universal para la identificación de especies bacterianas, ya que cada especie posee una secuencia exclusiva.
- 2.- Su estructura y su función es constante a lo largo del tiempo. Por ello, un cambio en la secuencia refleja una evolución aleatoria y lenta. Aporta información acerca de los organismos procariotas a lo largo de la escala evolutiva, pudiéndose identificar su posición evolutiva.
- 3.- Tiene un tamaño largo, 1500 nt, que minimiza las fluctuaciones estadísticas.

Por lo tanto, con estas características resulta relativamente fácil secuenciar los fragmentos de 16S rARN, y comparar los resultados con las bases de datos existentes.

2.1.2. Bases de datos del gen 16S rARN.

La identificación de bacterias está fuertemente relacionada con la existencia de bases de datos. Existen múltiples bases de datos, pero las que se utilizan de forma más generalizada son RDP, Greengenes y BLAST que están en continua expansión.

2.1.2.1. Ribosomal Database Project (RDP).

Es una de las más importantes fuentes para la identificación de bacterias, ya que sólo se encuentran registrados genes ribosomales de procariotas y arqueas. Se encuentran depositadas en torno a 623.174 secuencias y cuenta con excelentes herramientas para la detección de anomalías en ellas. Además, se pueden procesar las secuencias obtenidas en la pirosecuenciación, mediante comparación y nos ayuda a elegir el número de secuencias adecuadas. Existen diferencias con el resto de bases de datos que hacen que esta sea una de las más usadas, como son:

- 1.- La aplicación de 3 tipos de clasificaciones de las secuencias antes de identificarlas: (i) si son ambientales o sólo muestras específicas; (ii) inclusión de secuencias por longitud: menores o mayores de 1200 pares de bases; y (iii) si son secuencias de cepas tipo o sólo de cepas no tipo.
- 2.- La búsqueda de secuencias similares a la secuencia problema sin tener que alinear previamente éstas.

2.1.2.2. Greengenes.

Es la base de datos en las que se encuentran más secuencias del gen 16S rARN, por lo cual aquellas secuencias, sobre las que se ha trabajado y a las que se les han eliminado las indeterminaciones, y se quieren comparar con las que ya están publicadas y pudiéndose identificar, de esta manera, la bacteria problema. Es un proyecto que ofrece, entre otras funciones, el chequeo de las secuencias completas del gen 16S rARN para poder detectar las quimeras (DeSantis *et al.*, 2006) y que además posee

herramientas para el diseño de microarrays. También hay que añadir que esta base de datos es compatible con otras como ARB.

2.1.2.3. BLAST.

Es la base de datos más usada para la anotación y predicción funcional de genes o secuencias proteicas. No es un sistema específico de los genes asociados a las subunidades ribosomales como las anteriores, aunque posee herramientas para poder tratar las secuencias y que nos ayudan a la búsqueda de genes ortólogos, por ejemplo. BLAST usa un algoritmo heurístico por lo que no garantiza que ha encontrado la solución correcta. Por lo general, cuando una nueva secuencia es obtenida, se usa esta base para compararla con otras secuencias que han sido previamente caracterizadas, para así poder conocer su función.

2.2. Técnicas de estudio de la microbiota intestinal.

Los métodos de análisis de la microbiota intestinal se centraban clásicamente en el aislamiento de las bacterias en medios de cultivo para, y su posterior identificación, mediante el estudio de sus características fenotípicas y pruebas bioquímicas (Maccaferri *et al.*, 2011). Más tarde, los métodos bioquímicos se apoyaron en la variación de las secuencias de ADN, que diferencian las distintas especies presentes en la microbiota.

Posteriormente, se comenzaron a usar para el estudio de la microbiota intestinal distintos tipos de técnicas moleculares. Estas técnicas se diferencian en dos tipos: técnicas tipo *finger-printing* como la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) y la electroforesis en gel por gradiente desnaturizante (DGGE) que distribuyen a los individuos en distintas especies acorde a pequeñas variaciones en la secuencia de su material genético; y, por otro lado, están aquellas que se centran en secuencias específicas de ADN como son la hibridación *in situ*, FISH y la secuenciación capilar de Sanger del gen *16S rARN*.

Estos sistemas han ayudado hasta ahora a entender el complejo ecosistema del intestino, pero proporcionando una información incompleta, ya que sólo adquirimos los datos de aquellos taxones más abundantes. Por ello, se han ido desarrollando nuevas técnicas que ayudan a la secuenciación de aquellas bacterias que no son cultivables. Estas técnicas son más baratas, más resolutivas y dan más información a aquellos taxones que son minoritarios (Maccaferri *et al.*, 2011). El problema implícito de estas técnicas es que las secuencias que se analizan son cortas y, a veces, poseen errores de secuencia (Claesson *et al.*, 2009).

2.2.1. Secuenciación Sanger.

La secuenciación del ADN comenzó en 1977 cuando Frederick Sanger desarrolló el método de di-deoxinucleótidos y Maxam y Gilbert, los investigadores que desarrollaron el método químico (Maxam y Gilbert, 1977; Sanger *et al.*, 1977).

Hasta la aparición en las dos últimas décadas de los métodos de secuenciación tales como la pirosecuenciación, el método de Sanger era el método de elección más usado.

El método se basa en el ADN de cadena sencilla y en el uso de los di-deoxinucleótidos trifosfato (ddNTP) como terminadores. Por ello, previo al proceso de secuenciación se debe abrir la doble hélice de ADN para dar lugar a una hebra molde (ssADN). Los ddNTPs usados son de dos tipos, (1) marcados por medio de radiactividad o bien por fluorescencia; y (2) aquellos que carecen del grupo 3'-OH necesario para que la enzima ADN polimerasa siga alongando la cadena de ADN. Por ello, una enzima ADN polimerasa se usa en 4 tipos de reacciones distintas en donde se añade sólo un tipo de ddNTP (dATP, dGTP, dCTP o dTTP). De este modo se producen varios fragmentos de ADN de longitud variable. Los fragmentos sintetizados y marcados se vuelven a desnaturizar por calor y separados por tamaño en una electroforesis desnaturizante con urea. Para finalizar, cada una de las reacciones se analiza en carriles individuales que corresponden a cada ddNTP, visualizándose el resultado por medio de luz ultravioleta (Fig. 8).

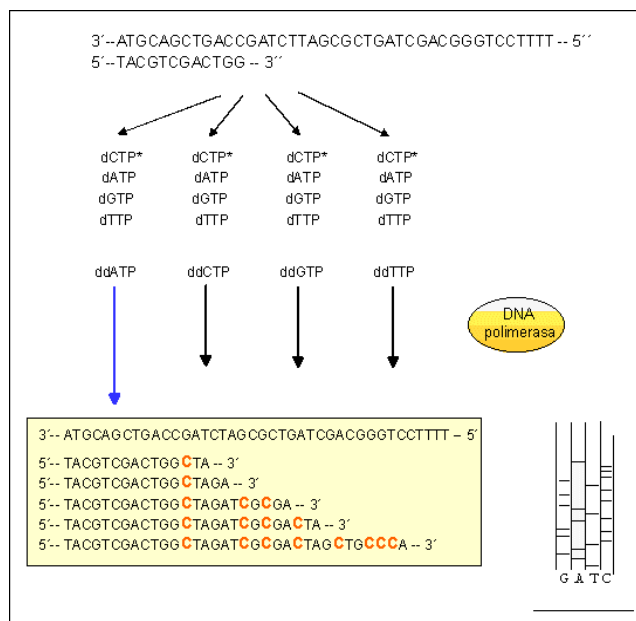


Figura 8: Representación esquemática de la secuenciación de Sanger. Se observa la incorporación de los nucleótidos y la acción de la ADN polimerasa en el proceso (imagen procedente de la web: <http://www2.iib.uam.es/seq/tecnicas/sanger.htm> de la Universidad Autónoma de Madrid).

Las mejoras en el coste/beneficio y el desarrollo de nuevas técnicas como son los marcadores fluorescentes, separación por capilaridad y preparación de la cadena templada mejoraron las condiciones de este tipo de secuenciación, ya que se eliminaron las etapas intermedias, como el *screening* por análisis de restricción.

2.2.2. Secuenciación automática en geles desnaturalizantes.

Con este método, la secuenciación del ADN se realiza con secuenciadores ABI Prism 377 que llevan asociados un sistema de electroforesis y detección de fluorescencia controlada por un microprocesador que se utiliza para análisis de fragmentos de ADN (Fig. 9).

La emisión de fluorescencia detectada tras la excitación mediante un láser de cada fragmento separado electroforéticamente en el capilar es transformada por el *software* del equipo en una secuencia de ADN. Los equipos más productivos trabajan de forma

continúa con 96 o 384 capilares independientes, cada uno de los cuales puede identificar en 1 hora aproximadamente 1.000 pares de bases.

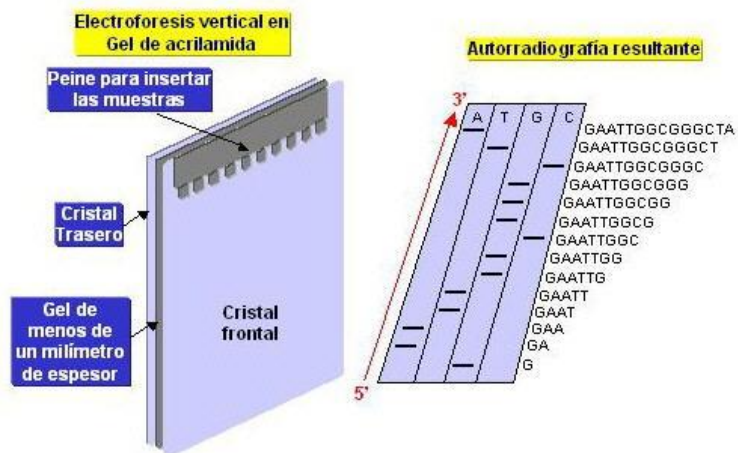


Figura 9: Representación de la secuenciación automática en geles desnaturalizantes.

2.2.3. Pirosecuenciación.

La pirosecuenciación se basa en el principio de secuenciación por síntesis, descrito por primera vez en 1985 (Melamede y Wallace, 1985). Este método consiste en la detección eficiente de la incorporación secuencial de nucleótidos durante la síntesis de ADN (Ronaghi *et al.*, 1996). Incluye la actuación de cuatro enzimas que se implican en un sistema de reacciones en cascada.

Durante la reacción el fragmento de Klenow de la ADN polimerasa I sustrae moléculas de pirofosfato inorgánico (PPi), para la adición de un nucleótido a una cadena sencilla de ADN. La segunda reacción, que catalizada por la ATP sulfurilasa, produce ATP usando el PPi liberado en la reacción anterior. El ATP se convierte en una señal luminométrica por acción de la luciferasa, que se detecta sólo cuando el par de bases está formado con el ADN molde y es proporcional al número de bases incorporado. Finalmente, las bases que se han unido y el ATP no usado se degradan por la acción de la enzima apirasa.

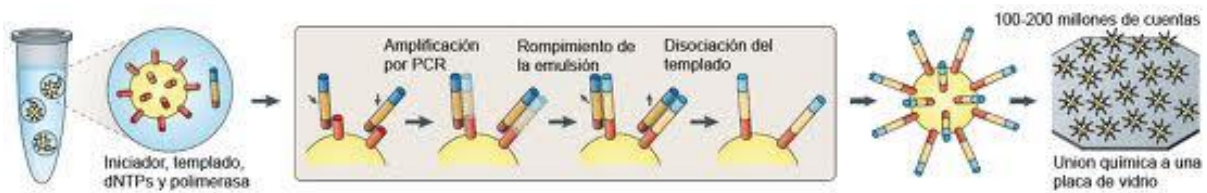


Figura 10: Resumen del proceso de pirosecuenciación. Se pueden observar las *beans* y la presencia de secuencias cortas asociadas a las mismas que dan lugar a la amplificación de secuencias en emulsión (imagen extraída de la web www.esacademic.com).

Existen varias plataformas que dan lugar a la pirosecuenciación, pero la que es más usada es la 454, descrita por primera vez por Margulies *et al.*, en 2005. En este momento se optimizó un protocolo sobre un soporte sólido, en el que el ADN a estudio se fragmentaba y se inmovilizaba en una especie de bolitas o *beans* para pasar posteriormente a una PCR de emulsión, dando lugar a una secuenciación masiva (Fig. 10).

2.2.4. *Microarrays.*

El *microarray* o chip es una tecnología poderosa que puede detectar simultáneamente cientos de genes en un solo portaobjetos de cristal o superficie de silicona (Gentry *et al.*, 2006). Se usa esta técnica mayoritariamente en análisis de expresión de genes, pero también se puede usar para la identificación y, recientemente, se usa para la exploración de la diversidad de una comunidad específica y su ambiente. En este caso, se usan secuencias específicas para microorganismos de diferentes taxones (Fig. 11).

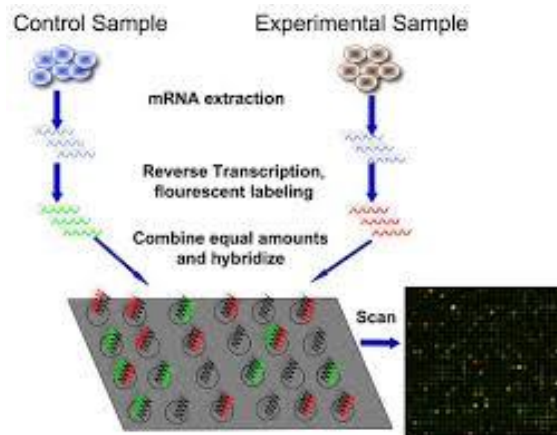


Figura 11: Esquema de trabajo para el uso de *microarrays* (imagen perteneciente a la web: www.bitesizebio.com/7206/introduction-to-ADN-microarrays/)

2.2.5. Limitaciones de las técnicas descritas.

Los métodos descritos poseen limitaciones, ya que mediante su utilización no se puede caracterizar el componente funcional de una muestra. La solución a este problema puede realizarse por medio de otra aproximación como la metagenómica. En este caso, con los estudios metagenómicos, se podría identificar la capacidad metabólica de una comunidad microbiana y vislumbrar, así, los genes adaptativos que le confieren un beneficio en la supervivencia en un determinado hábitat.

3. CARACTERIZACIÓN DEL MICROBIOMA.

Para poder entender qué es el Microbioma, primero se debe de entender qué significa el término Microbiota: es el conjunto de microorganismos (bacterias, virus y hongos) que colonizan diferentes hábitats. Dentro de los hábitats posibles nosotros nos referimos a seres vivos colonizando tanto las superficies externas como internas de los órganos, en principio, sin producir ninguna enfermedad. También se puede hablar de la microbiota de las superficies inertes, ya que en los objetos también existe un conjunto de bacterias que son específicas. Microbioma, por lo tanto se refiere al genoma de las bacterias pertenecientes a la microbiota.

Como describió Eckburg *et al.* (2005), en el caso de los seres vivos, la Microbiota se considera como un órgano en si mismo, realizando importantes funciones que dan lugar a una correcta fisiología. La microbiota intestinal juega un papel crítico en la nutrición, desarrollo, metabolismo, resistencia a patógenos y respuesta inmune, entre otras. Estas funciones dan lugar a que se produzca un estado de homeostasis o equilibrio en los individuos. Los beneficios obtenidos se deben a la relación de simbiosis existente entre el hospedador y los microorganismos, que de este modo se aseguran un nicho ecológico y los nutrientes necesarios para su supervivencia y reproducción. No todas las superficies son óptimas en cuanto a las condiciones (temperatura, salinidad, pH, oxígeno), por lo tanto, los microorganismos deben ser capaces de sobrevivir en condiciones extremas como las que se pueden encontrar en el intestino (anoxia, pH ácido, etc.) así como movimientos mecánicos que continuamente cambian la conformación espacial del mismo.

3.1. Proyecto Microbioma Humano.

Tras el estudio pormenorizado de las secuencias de genes pertenecientes al ser humano, dentro del marco del Proyecto Genoma Humano (PGM), se llegó a la conclusión de que existían bastantes menos genes codificantes de los que se esperaban, ya que se encontraron en torno a 20.000 y no 100.000 que fueron previamente predichos. La primera hipótesis fue que la microbiota normal portaba la mayoría de los

genes que se esperaba encontrar. Por ello, se debía de considerar al ser humano como un supraorganismo compuesto de células eucariotas y procariotas (Turnbaugh *et al.*, 2007). Según los estudios realizados por los investigadores del PGM, el 90% de las células que forman el ser humano son de origen bacteriano o fúngico, de ahí la gran importancia de conocer la microbiota del ser humano ya que la actividad de los microorganismos asociados al hombre son los responsables de su supervivencia. De los millones de microorganismos caracterizados, la mayoría habita en el colon y según Turnbaugh (2007), el 90% pertenecen a, sólo, 2 de los 70 filos conocidos: Firmicutes y Bacteroidetes.

Para entender la genética humana se debían de caracterizar los microorganismos que colonizan al ser humano, los factores que influyen en su distribución y la función que tienen dentro del ser humano. Este es el objetivo principal del PGM. Aunque, en sí, no es un proyecto, es una parte más dentro del Proyecto Genoma Humano y se concibió como un esfuerzo interdisciplinar a nivel mundial (Estados Unidos, y la mayoría de los países de Europa y Asia).

Las contribuciones de la microbiota intestinal en la salud de los seres humanos y de los animales se pueden observar en los siguientes puntos:

1.- Acceso a nutrientes o trazas de energía de la dieta y síntesis de vitaminas:

El valor nutritivo y energético de los alimentos no se obtiene de forma absoluta, es decir, en parte dependerá de la microbiota intestinal individual. De este modo, su estudio puede ser una guía para determinar qué persona está en riesgo de malnutrición u obesidad pudiendo crear tratamientos personalizados basados en su ecología microbiana (Backhed *et al.*, 2004).

2.- Metabolismo de xenobióticos y otros metabolitos:

La microbiota intestinal es un regulador desconocido del metabolismo de fármacos y su biodisponibilidad. Las funciones pueden estar relacionadas con la biorremediación, en especial en la detoxificación de carcinógenos que han sido ingeridos. Un ejemplo es el metabolismo del oxalato por la microbiota que se relaciona

con la predisposición a las piedras en el riñón. Por lo cual, se debe de incluir la microbiota dentro del repertorio de biomarcadores de susceptibilidad a enfermedades (Martin *et al.*, 2007).

3.- Renovación de las células del epitelio intestinal:

La renovación de las células, se debe en parte a las interacciones entre la microbiota y el sistema inmune. Además, se controla el crecimiento celular y con ello, la formación de neoplasias (Chu *et al.*, 2004). También se promueve la reparación de la barrera mucosa gracias a la acción de la microbiota intestinal (Pull *et al.*, 2005).

4.- Desarrollo y actividad del sistema inmune:

La microbiota intestinal tiene un efecto, tanto en la inmunidad innata como la adaptativa. Por ello, contribuye a los desórdenes inmunes, tanto fuera como dentro del intestino (Hooper *et al.*, 2003; Mazmanian *et al.*, 2005). Es decir, la susceptibilidad de la colonización por parte de enteropatógenos se ve afectada por la microbiota intestinal que altera la expresión de los genes del hospedador, codificando componentes antimicrobianos, y por lo tanto, modulando la respuesta inmune (Wellcome Trust Case Control Consortium, 2007).

5.- Comportamiento:

La microbiota intestinal altera la producción de neurotransmisores que influyen en el comportamiento. Tal afirmación está apoyada por el estudio con ratones gnotobióticos, puesto que se modulan, se ha comprobado, la expresión de genes asociados a la biosíntesis o metabolismo de los neurotransmisores (Backhed *et al.*, 2004; Backhed *et al.*, 2007).

En el caso del intestino del hombre, y de los animales, la microbiota representa un sistema anaeróbico compuesto por una población muy diversa de bacterias. Esta microbiota y sus genomas proporcionan unas características metabólicas adecuadas para utilizar nutrientes externos (Fig. 12). Mediante su estudio, se puede observar la predisposición a enfermedades, por ejemplo, de manera que el conocimiento sobre la

microbiota intestinal y su regulación, nos ayudaría, en un futuro, a mejorar la salud del hombre y animales.

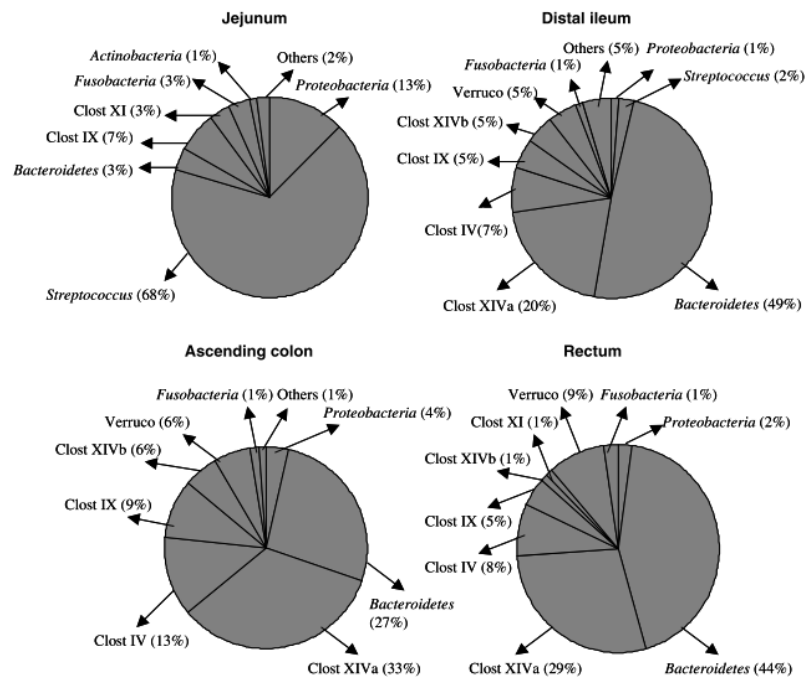


Figura 12: Distribución filogenética de las bacterias en las diferentes partes del intestino humano. Se observa que los géneros mayoritarios son *Verrucomicrobia*, *Clostridium* y *Streptococcus* (Wang *et al.*, 2005)

Estudios recientes (Bäckhed *et al.*, 2005) muestran como la microbiota intestinal en el hombre ha coevolucionado con él para producir un mutualismo beneficioso para ambos. A esa microbiota se le conoce como núcleo o *core* (Fig. 13), ya que permanece más o menos invariable a lo largo del tiempo.

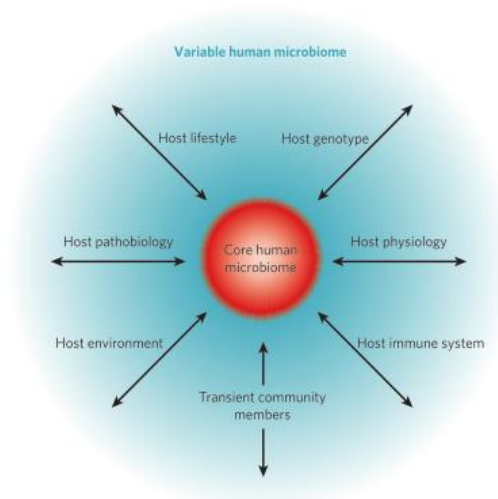


Figura 13: Modelo esquemático del concepto *microbiota núcleo* centrada en las interacciones con el medio (tipo de vida, genotipo del hospedador, patologías, ambiente, sistema inmune, etc.) (Turnbaugh *et al.*, 2007).

3.1.1. Metagenómica.

La metagenómica se define como la técnica que realiza un análisis genético directo de los genomas contenidos en una muestra. Por ello, también es llamada *genómica ambiental* o *genómica de comunidades*, sin la necesidad de tener que aislar los microorganismos previamente (Broderick *et al.*, 2004; Riesenfeld *et al.*, 2004). Esto constituye una gran ventaja, ya que se cree que con los métodos tradicionales, basados en el aislamiento y cultivo previo de los microorganismos, se descartan una alta proporción de microorganismos por muestra (Venter *et al.*, 2004; Tyson *et al.*, 2009).

Los estudios metagenómicos se ven favorecidos por el desarrollo de técnicas de nueva generación de secuenciación de ADN y por la importancia creciente de la interacción de las comunidades microbianas complejas con sus hospedadores, tanto en animales como en el ser humano. El Proyecto Microbioma Humano fue aprobado en mayo de 2007 y se considera para su estudio la población de microorganismos que colonizan el cuerpo humano desde el tracto gastrointestinal, tracto genitourinario, cavidad oral, tracto respiratorio y

la piel. Los microorganismos constituyentes del microbioma son bacterias, hongos, mayoritariamente levaduras, y virus cuya cantidad, sorprendentemente, de

genes es 100 veces mayor a todos los pertenecientes al ser humano, que ejerce la función de hospedador. Estos genes presentan una gran diversidad y codifican un amplio rango de proteínas, cuya función influye en la bioquímica y fisiología del hospedador. Esta relación es, pues, mutualista ya que ambas partes (microorganismos y hospedador) obtienen un beneficio.

La ventaja de la metagenómica se debe fundamentalmente a la información obtenida de la estructura de comunidades (riqueza de especies y distribución) y de sus genomas, entre los que destacan los hongos, arqueas y virus y su función potencial metabólico (Hugenholtz y Tyson, 2008). Este conocimiento puede aumentar la información de la relación existente entre el hospedador y el microorganismo, con aplicación, por ejemplo, en los estados de salud y enfermedad. Estudios recientes han revelado la capacidad funcional de los organismos del aparato gastrointestinal de diversas especies, incluyendo el ser humano (Kurokawa *et al.*, 2007; Turnbaugh *et al.*, 2009), roedores (Turnbaugh *et al.*, 2006, 2008), ciervos (Brulc *et al.*, 2009) y pollos (Qu *et al.*, 2008).

El sistema de estudio metagenómico más desarrollado y práctico es la pirosecuenciación, especialmente el sistema 454 (Margulies *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2012). Debido a la amplia cantidad de información obtenida es imprescindible el desarrollo de nuevas técnicas más potentes y rápidas, así como de nuevos sistemas de análisis de datos que permitan inferir nuevos resultados y conclusiones. Con esta innovación, se lleva inherente el avance de las aplicaciones informáticas que dan lugar al estudio de las miles de especies que existen en la microbiota, de un modo razonablemente rápido y barato. Por ejemplo, en el Proyecto Microbioma Humano se desarrollaron modos automatizados para los métodos de tipo “*high-throughput*” de los análisis metagenómicos, siendo necesaria la existencia de redes computacionales con un servidor robusto, debido al flujo continuo y masivo de información.

De esto modo, el análisis sencillo de grandes tamaños de información da lugar a un mayor desarrollo del conocimiento y a la posibilidad de poder responder preguntas muy significativas en materia de biología, biomedicina u otras áreas del conocimiento (Fig. 14).

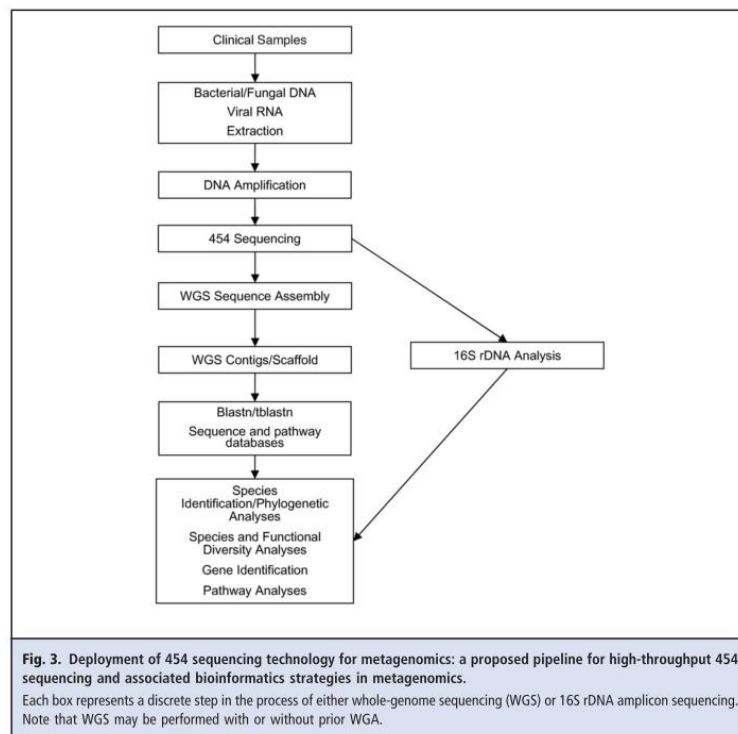


Figura 14: Estrategias para la identificación de especies bacterianas en el intestino y relación directa con el gen *16S rARN* (imagen perteneciente a Petrosino *et al.*, 2009).

Por lo tanto, gracias al desarrollo de la metagenómica se han podido caracterizar los genomas de las diferentes comunidades microbianas, usando para ello las técnicas de secuenciación masiva y desarrollando nuevas tecnologías para tal desempeño que dan lugar a la caracterización de las diferentes bacterias que forman parte de la microbiota.

3.1.2. Adquisición de la microbiota y sus modificaciones en las diferentes etapas de desarrollo en el ser humano.

La adquisición de la microbiota intestinal está determinada por el modo en que nacen los seres humanos (Ravel *et al.*, 2011; Murgas *et al.*, 2011).

Cuando se nace por vía vaginal, la adquisición se produce por medio de la rotura de las membranas que recubren al bebé. Esto favorece la colonización de *Lactobacillus*, *Prevotella* y *Atopobium* (Ravel *et al.*, 2011). Aquellos bebés que nacen por medio de cesárea no reciben esta aportación desde el conducto del parto y no es hasta que el

neonato entra en contacto con la piel de la madre que es colonizado por bacterias (Domínguez-Bello *et al.*, 2010). Por ello, la microbiota intestinal que se encuentra constituida, de forma mayoritaria, por bacterias pertenecientes a los géneros *Staphylococcus*, *Corynebacterium* y *Propionibacterium* siendo la detección de *Bifidobacterium* y *Bacteroides* menor (Ravel *et al.*; 2011; Murgas *et al.*, 2011; Domínguez-Bello *et al.*, 2010). Esta microbiota irá variando a lo largo del tiempo debido a una serie de interacciones entre el hospedador y el ambiente, que involucran la dieta, el estilo de vida, las enfermedades y el uso de antibióticos (Nicholson *et al.*, 2003).

A diferencia de lo esperado, la leche materna no es estéril, por lo que contiene una serie de bacterias ácido-lácticas con propiedades probióticas que son comensales del intestino del recién nacido, siendo mayoritarios los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* y *Lactobacillus* (Olivares M *et al.*, 2008). Las primeras variaciones en la microbiota intestinal se deben a los cambios paulatinos derivados del tipo de alimentación en el bebé y comienzan a aparecer las bacterias anaerobias estrictas en el intestino (Mackie *et al.*, 1999; Mitsou *et al.*, 2008).

En la senescencia, sin embargo, se produce el envejecimiento de los tejidos, incluyendo la mucosa intestinal y la inmunosenescencia. Además, y como consecuencia del cambio de hábitos alimentarios que afectan la composición de la microbiota, la disminución de bacterias del filo *Bacteroidetes* (Nicholson *et al.*, 2012; Mariat *et al.*, 2009)

3.1.3. Cambios fisiológicos asociados a la microbiota.

Los organismos que forman la microbiota intestinal, además de actuar como barrera defensiva a la colonización de bacterias patógenas, pueden estar involucradas en otras funciones. Existen estudios que avalan el papel esencial de la microbiota intestinal en el metabolismo, en la respuesta inmunitaria y en la biodisponibilidad de diferentes fármacos (Angelakis *et al.*, 2012). Esta puede ser la diferencia entre ser susceptible, o no a diferentes enfermedades, o a la respuesta a la terapia (Nicholson *et al.*, 2003; Viaud *et al.*, 2013). Las enfermedades que se asocian a una deficiencia de la

microbiota intestinal en los niños son, por ejemplo, algunos tipos de asma y enfermedades enterohemorrágicas. Un hecho comprobado es que la poca exposición de los niños a las bacterias debido a una excesiva higiene da lugar a la aparición de enfermedades autoinmunes y según Rook (2010), esto es debido a un mínimo contacto con antígenos microbianos, con la consecuente disminución de la expresión de citoquinas inmunomoduladoras.

3.1.4. Microbiota y fármacos: nuevos enfoques, nuevas funciones.

La interacción entre fármacos y bacterias es un proceso que presenta elevada reciprocidad en los beneficios obtenidos. Los antibióticos y otras sustancias afectan a la síntesis de los ácidos nucleicos o pueden modificar la permeabilidad de la pared microbiana, dando lugar al control tanto bacterioestático como bacteriolítico de las células procarióticas, tanto de la microbiota normal, como de aquellas bacterias que son patógenas y extrañas. Las bacterias son capaces de sintetizar enzimas que actúan sobre los fármacos dando lugar a la modificación de su actividad, y por ello, del efecto terapéutico (Jernberg *et al.*, 2010). Este proceso puede realizarse de forma directa, ya que las enzimas bacterianas actúan sobre el fármaco haciendo que tenga mayor o menor actividad, como sucede en el caso de la activación de la sulfasalazina (Sousa *et al.*, 2008) o de la inactivación de la digoxina (Saha *et al.*, 1989).

De una forma indirecta, también puede ocurrir una variación de la composición del fármaco, por ejemplo con metabolitos secundarios que actúan sobre las enzimas del hospedador y, por ello, modificando la capacidad de biotransformar los medicamentos (Maurice *et al.*, 2012).

3.2. Otras microbiotas y microbiomas.

3.2.1. Transmisión maternal de la microbiota en vertebrados distintos al ser humano.

La transmisión de la microbiota intestinal, en animales que no son mamíferos, es maternal aunque poco se conoce sobre ello. A lo largo de los años, estudios se han

enfocado en el conocimiento de la transmisión, en especial, en animales que son de interés para el hombre, como son el pollo y los peces.

Los pollos adquieren *Salmonella* desde la cáscara contaminada, mediante transmisión horizontal, pero se han encontrado casos en los que la transmisión es directamente transovárica, y en el caso de que las bacterias colonizan los tejidos del aparato reproductor de las gallinas (Gantois *et al.*, 2009). El recorrido de las bacterias que conforman la microbiota, es desde los tejidos a la yema, albúmina, membrana y cáscara. Se han encontrado en la yema de huevo otros patógenos como *Mycoplasma synoviae* (MacOwan *et al.*, 1984) en pollos y *M. gallisepticum*, *M. cloacale* y *M. anatis* (Bencina *et al.*, 1988) en patos.

En peces de la clase *Actinopterygii* muchos patógenos se transmiten de modo transovárico, encontrándose en la yema *Renibacterium salmoninarum* que es un agente patógeno que produce enfermedades en los riñones de los salmónidos, y *Flavobacterium psychrophilum*, que cause enfermedades en salmónidos y truchas arcoiris (Brown *et al.*, 1997). *Flavobacterium psychrophilum* se ha detectado a partir de fluido ovárico y en la superficie de los huevos de truchas.

El pez cebra (*Danio rerio*) se encuentra un patógeno intracelular obligado, *Pseudomonas neutrophilia*, que se encuentra en el estroma ovárico y dentro de las células foliculares del mismo, por lo que se sugiere que la transmisión es de tipo vertical (Sanders *et al.*, 2012).

En el caso de las tortugas (orden *Chelonii*), la formación de los componentes de los huevos en el tubo uterino y útero y tiene lugar durante dos semanas, por lo que la transmisión desde el intestino o desde el aparato reproductor puede ocurrir en este tiempo (Alkindi *et al.*, 2006). Las bacterias que se han encontrado de forma mayoritaria en tortugas son *Pseudomonas aeruginosa* y *Serratia marcescens*.

3.2.2. Ejemplos de otras microbiotas.

En estos últimos años, se han estudiado las microbiotas intestinales y sus microbiomas en varios tipos de animales. Algunos de estos tienen gran importancia en la producción como pueden ser las abejas productoras de miel o bien animales de gran importancia ecológica como es el emú y el oso panda.

3.2.2.1. Mamíferos (oso panda gigante).

El oso panda gigante (*Ailuropoda melanoleuca*) pertenece a la familia de los Úrsidos dentro del orden de los Carnívoros y es uno de los animales más importantes a nivel mundial en peligro de extinción. Tan sólo existen 2.500 individuos en el este de China (Fig. 15), y en Parques Zoológicos distribuidos por otros países.



Figura 15: Oso panda gigante en un bosque de China (imagen perteneciente a la web www.educa.org).

Al ser un animal carnívoro, no posee ciego dentro del intestino, lo que implica que está más adaptado a la digestión de carne que de bambú, que es la dieta preferente de estos animales. El estudio de su genoma pone de manifiesto que, además, posee todas las enzimas necesarias para la digestión de carne pero no para la digestión de lignocelulosa, que es el componente mayoritario del bambú. También existen evidencias claras de la presencia de bacterias que portan los genes putativos que codifican las enzimas para la digestión de la hemicelulosa, celulosa y lignina (tales como la celulasa, beta- glucosidasa, xilano 1,4-beta-xilosidasa, endo-1,4-beta-xilanasas, lacasa) (Fig.16).

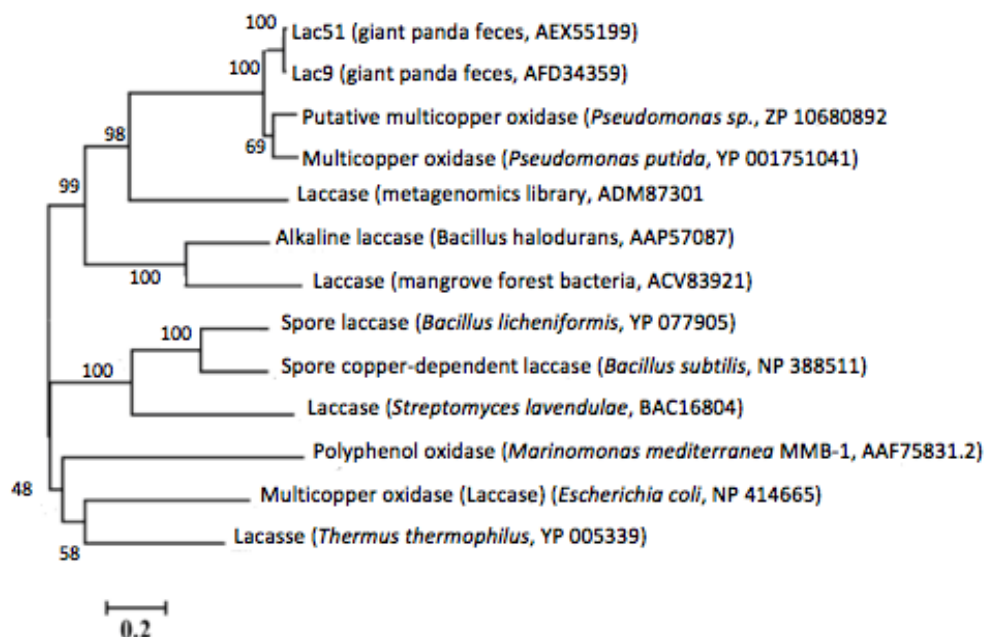


Figura 16: Filogenia de la enzima lacasa. Se observa la relación filogenética de la enzima lacasa existente en la microbiota intestinal del oso panda gigante y de bacterias ambientales que degradan la lignocelulosa y celulosa (Fang *et al.*, 2012)

Las secuencias del gen *16S rARN* obtenidas del intestino de este mamífero determinaron que pertenecían a las clases de las Alfarproteobacteria, Gammaproteobacteria y Clostridia. Dentro de los filotipos detectados, los *Clostridium* del grupo I son capaces de digerir la celulosa y la hemicelulosa del bambús. La lignina forma una matriz con las moléculas citadas y las bacterias identificadas capaces de digerirla fueron *Sphingomonas* sp., *Pseudomonas* sp.; *Rhodococcus*, *Nocardia*, y *Streptomyces*. De este modo, el oso panda es capaz de obtener los nutrientes necesarios para poder alimentarse sin carencias nutricionales.

3.2.2.2. Aves (emú).

El emú (*Dromaius novaehollandiae*) es un pájaro no alado de tamaño grande y nativo de Australia que es importante porque su grasa que se usa como aceite y su carne como alimento. Su alimentación es omnívora, ya que ingiere una gran variedad de plantas e insectos (Fig. 14).



Figura 17: Emú adulto (perteneciente a la web: www.insolitanaturaleza.com)

Poseen un sistema gastrointestinal relativamente sencillo, presentando ciego y recto (Devriese *et al.*, 1994; Stevens y Hume, 1995). Sin embargo, no tienen bien desarrollado el intestino para la fermentación. El tiempo de retención digestiva es corto por lo que son capaces de digerir el 35-45% de la fibra neutra de la dieta y que contribuye a mantener los requerimientos energéticos necesarios (Herd y Dawson, 1984). El emú no posee las enzimas necesarias para digerir los polisacáridos complejos, por lo que esta habilidad debe ser aportada por la microbiota intestinal (Flint *et al.*, 2012). Estas bacterias no sólo juegan un papel importante a nivel nutricional, sino también a nivel de salud y fisiología (Kohl, 2012).

En el estudio de la microbiota del ciego en emúes, pavos, pollos, ratites y urogallos se observó que el filo más prevalente fueron las bacterias pertenecientes a los filos Bacteroidetes y Synergistetes (Fig. 18). Tales bacterias se caracterizan por su capacidad de degradación de los polisacáridos de plantas y por su metabolismo fermentativo (Flint *et al.*, 2008, 2012), como sucede también en los pavos (Scupham *et al.*, 2008) y las gallinas (Callaway *et al.*, 2008; Nordentofl *et al.*, 2011), pero no en el caso de las avestruces y otras aves, donde el filo mayoritario es son Firmicutes (Matsui *et al.*, 2010).

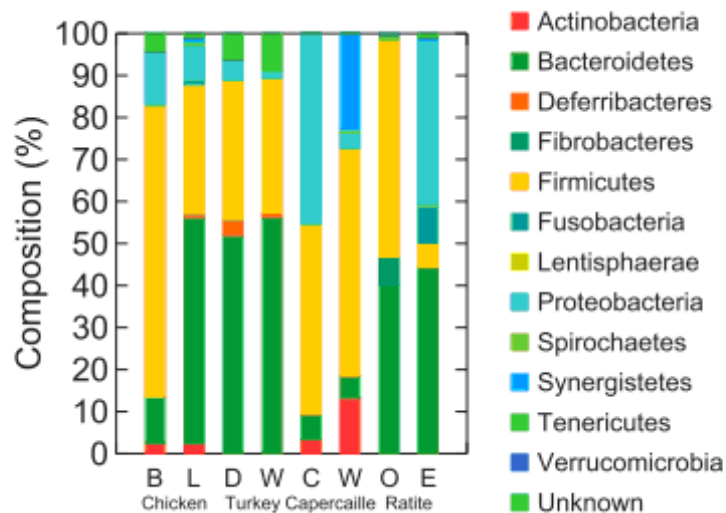


Figura 18: Composición y porcentaje de cada uno de los filos encontrados en aves. Se puede observar en la columna E, la correspondiente al emú e inferir que los filos mayoritarios son Bacteroidetes y Synergistetes.

3.2.2.3. Peces (pez cebra).

El pez cebra (*Danio rario*), pertenece al Superorden *Ostariophys* y es omnívoro de agua fría. Se encuentra originariamente en Pakistán, India, Bangladesh, Nepal y Burma (Engeszer *et al.*, 2007) (Fig. 19). Se ha estudiado ampliamente su fisiología y se utiliza como modelo animal por su pequeño tamaño y su rapidez a la hora de reproducirse.



Figura 19: Tres individuos adultos de pez cebra (imagen perteneciente a la web www.medciencia.com).

Los estudios preliminares de la microbiota intestinal indican que, en todos los estadios de la vida del pez, los filos mayoritarios son Proteobacteria, Firmicutes y Fusobacteria (Fig. 20). Es curioso saber que, en el caso del pez cebra, la composición de las bacterias depende de la domesticación. Este tipo de variación puso de manifiesto la existencia de un core o núcleo de bacterias constantes en los peces. Otro tipo de bacterias, sin embargo, que dependían del modo de vida del pez, es decir si eran peces salvajes o procedentes de la acuicultura y, por ello, domesticados. Las bacterias del género *Edwardsiella* que incluyen patógenos de agua fría como son *E. tarda* y *E. ictaluri* (Plumb, 1999; Pressley *et al.*, 2005; Petrie-Hanson *et al.*, 2007) no aparecen en peces domésticos. Si comparamos con el resto de peces, la microbiota, intestinal del pez cebra sería similar a la de los peces teleósteos de agua fría (Roeselers *et al.*, 2011).

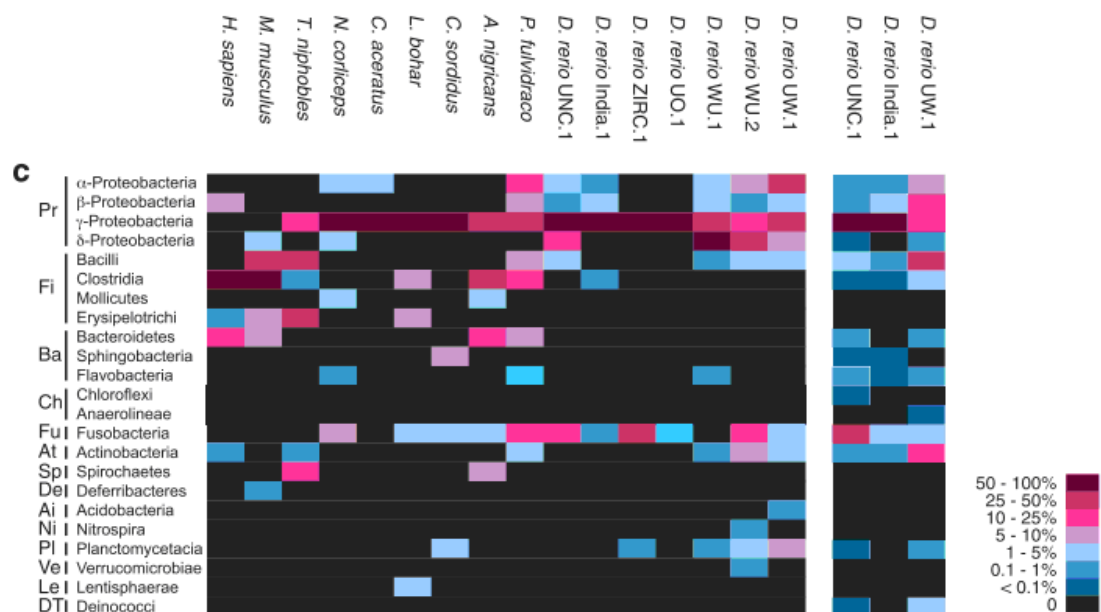


Figura 20: Composición y porcentaje de filos de la microbiota intestinal en diferentes especies de peces. Se observan las diferencias entre distintos peces cebra pero se concluye que los filos mayoritarios son Proteobacteria, Firmicutes y Fusobacteria (Roeselers *et al.*, 2011).

3.2.2.4. Insectos.

Los insectos son unos de los grupos taxonómicos más abundantes, en número de especies y en biomasa en la naturaleza (Basset *et al.*, 2003). La diversificación y el éxito

en la evolución ha dependido, en parte, de las relaciones de simbiosis con los microorganismos. Las dietas de los insectos suelen ser bastante pobres en nutrientes, por lo cual la función de los microorganismos es esencial para la digestión de los componentes alimenticios. Otras funciones de los microorganismos que están asociados a los insectos son la protección ante depredadores, parásitos y patógenos, además de la contribución a la comunicación inter e intraespecífica.

Como en el resto de los animales, la microbiota más abundante se encuentra en el tracto digestivo, con un papel determinante en el estilo de vida del hospedador (Engel y Moran, 2013). Los insectos tienen una gran relevancia en la agricultura, biomedicina y ecología debido a su modo de vida libre y, por consiguiente, la capacidad que tienen para acceder a todos los entornos. En el marco de la agricultura, el interés de la microbiota intestinal reside en la función del insecto en la polinización (Engel y Moran, 2013). En la biomedicina, los insectos adquieren un papel como vectores de enfermedades infecciosas y transmisión de genes de resistencia antibiótica (Ricci *et al.*, 2012; Chouaia *et al.*, 2012). En el área de la ecología ejercen una función crítica en la descomposición de la biomasa de plantas y en el ciclo del carbono (Lauber *et al.*, 2009) así como en la fijación del nitrógeno (Fox-Dobbs *et al.*, 2010).

La estructura del tracto digestivo de los insectos es constante, a pesar de que poseen modificaciones asociados al tipo de alimentación. Este tracto digestivo presenta tres partes diferenciadas: estomodeo, mesenterón y proctodeo. La diferencia más importante en cada una de las regiones es la variación del pH y la concentración de oxígeno (Fig. 21). Los insectos presentan grandes comunidades microbianas y se adaptan perfectamente a las condiciones de cada uno de los compartimentos.

Por ejemplo, el escarabajo *Pachnoda ephippiata* que se alimenta de estiércol, contiene grandes cantidades de acetato, formato y lactato en el estomodeo y mesenterón, por lo cual las bacterias deben estar adaptadas a vivir en un pH muy ácido.

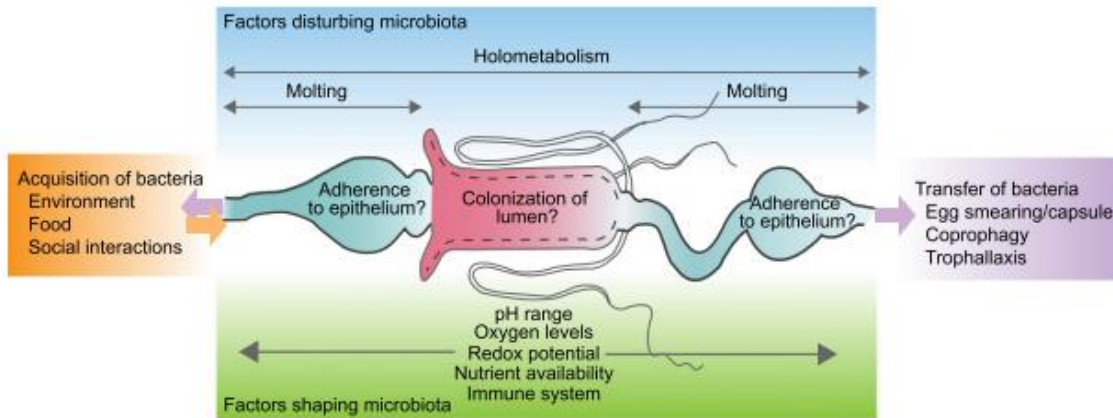


Figura 21: Factores que influyen en la composición de la microbiota intestinal: cada uno de los compartimientos del intestino de los insectos posee una característica propia que es determinante para la colonización bacteriana (Engel y Marion, 2013).

Se ha comprobado que la mayoría de insectos que se alimentan de sangre poseen en su microbiota intestinal bacterias de la clase Gammaprotobacteria como mayoritarias y, entre ellos, de los géneros *Pseudomonas*, *Serratia* y *Enterobacter* (Dinparast *et al.*, 2011; Terenius *et al.*, 2012) y disminuyendo drásticamente el número de bacterias entéricas (Wang *et al.*, 2011). *Serratia* y *Enterobacter* poseen enzimas hemolíticas que pueden dar lugar a la digestión de los componentes de la sangre como son los aminoácidos, ácido cetovalérico y glicina (Gusmao *et al.*, 2007; Campbell *et al.*, 2004; De Gaio *et al.*, 2011). En cambio, *Pseudomonas* produce la mejora del desarrollo larvario en medios ricos en fósforo (Peck *et al.*, 2006).

Los mosquitos pertenecientes a la familia *Culicidae* comprenden más de 3.500 especies con una distribución mundial (Becker, 2003). La mayoría de las especies pertenecen a los géneros *Aedes*, *Anopheles* y *Culex*, incluyendo un gran número de especies que transmiten enfermedades infecciosas y parasitarias, siendo de gran importancia en la salud pública y en la sanidad animal (Cumberland, 2009). Mosquitos del género *Anopheles* pueden portar parásitos como *Plasmodium*; *Aedes* y *Culex* son responsables de la transmisión de arbovirus que incluyen la enfermedad del Dengue (Flavivirus), del virus de la Encefalitis Japonesa o de parásitos como *Wuchereria bancrofti* u *Onchocerca volvulus* que producen filariasis (Minard *et al.*, 2013). El estudio de la

microbiota intestinal de los mosquitos es importante, ya que parte de la misma puede extenderse fácilmente debido a sus hábitos alimenticios. Estos hábitos se caracterizan por obtener sangre de animales de sangre caliente, y es específico de las hembras para poder mantener su ciclo vital. Por ello, los estudios se centran en conocer la composición de la microbiota intestinal para poder modificarla y controlar la diseminación de enfermedades infecciosas. La microbiota intestinal comprende una proporción mayoritaria de bacterias del filo de las Proteobacteria, en torno al 86% de la clase de las Gammaproteobacteria y en bastante menor proporción, Firmicutes (Minard *et al.*, 2013). El género *Asaia* tiene una microbiota intestinal bastante estable pero no se puede determinar si es endosimbionte, ya que no posee las estructuras típicas, los bacteriocitos, como sucede en cucarachas y algunos géneros de escarabajos (Douglas *et al.*, 1989, 1998; Baumann *et al.*, 2005; Demaio *et al.*, 2006).

Las moscas tse-tse (*Glossina* spp.) son vectores de un tripanosoma (*Trypanosoma brucei*) que da lugar a la enfermedad del sueño en humanos. Son moscas que se alimentan exclusivamente de sangre y, que a pesar de no ser un insecto polífago, nos ayuda a ilustrar la importancia de los simbiositos en los artrópodos. La sangre de los artrópodos es deficiente en vitaminas del complejo B, por lo cual la mosca tse-tse alberga dos bacterias simbióticas en el intestino, que se transmiten por vía materna a la larva y se le administran vitaminas de este tipo. Las bacterias que se encuentran mayoritariamente son: *Wolbachia glossinidia* (Gammaproteobacteria) endosimbionte primario, y *Sodalis glossinidius* (Gammaproteobacteria) que es un simbiote comensal secundario (Aksoy, 1995; Gosalbes, 2010). Gosalbes indicó en sus estudios que el genoma de *W. glossinidia*, endosimbionte intracelular, posee un 10% de genes (62 genes) relacionados con la biosíntesis de cofactores, grupos prostéticos y transportadores, incluyendo vitaminas (Akman *et al.*, 2002). *S. glossinidius* es tanto extracelular como intracelular y se encuentra mayoritariamente en el intestino medio de la mosca (Matthew *et al.*, 2005). Se ha comprobado que su genoma se ha reducido en comparación con las bacterias pertenecientes a este género y que son libres, pero tienen la peculiaridad de poseer tres plásmidos (Darby *et al.*, 2005) que se relacionan con la degradación de los genes cuya función no es necesaria en el organismo (Akman *et al.*, 2002; Toh *et al.*, 2006).

Las termitas (*Isoptera* o *Termitoidea spp.*) son insectos sociales ampliamente estudiados que se consideran una epifamilia de las cucarachas (relacionadas con el género *Blattaria*). Comprenden más de 2.600 especies (Lo y Eggleton, 2011) y son conocidos por la capacidad que tienen de alimentarse de la madera seca. El hecho de que puedan extraer nutrientes de la madera se debe a la relación existente con los microorganismos de la microbiota intestinal (Hongoh, 2011; Köhler *et al.*, 2012). La madera seca se compone de lignocelulosa, hemicelulosa y lignina. Son moléculas muy complejas que deben ser hidrolizadas por una serie de enzimas como son las celulasas, xilanasas, lacasas, etc. Aunque la enzima de mayor importancia es aquella que metaboliza la lignina, que es una molécula de tipo amorfo y recalcitrante compuesta por un esqueleto de C-C (Cornwell *et al.*, 2009).

En el estudio de la microbiota intestinal es especialmente interesante la utilización de los compuestos nitrogenados en cucarachas, termitas y hemípteros. El problema que existe es que no son capaces de sintetizar 9 de los 20 aminoácidos, por lo que hace que tengan un metabolismo deficiente. Las dietas de estos insectos son deficientes en proteínas y deben fijar el nitrógeno a través de los componentes nitrogenados para sintetizar sus propios aminoácidos. Las bacterias de la microbiota intestinal relacionadas con este proceso son las que pertenecen a los géneros *Bacteroides* y *Citrobacter* (Potrikus y Breznak, 1981).

Las cucarachas (López-Sánchez, 2009) son artrópodos que se consideran omnívoros, es decir, poseen una dieta muy pobre y, por lo tanto, deben poseer una microbiota compleja y muy especializada. Existen muchos estudios que determinan la existencia de endosimbiontes relacionados con el metabolismo de sulfatos y de aminoácidos en cucarachas. Las bacterias endosimbiontes más estudiadas son aquellas que pertenecen al género *Blattabacterium* (clase Flavobacteria, filo Bacteroidetes). Estas bacterias, por lo tanto, son simbiosis intracelulares que se encuentran en células del tejido graso de los insectos como las cucarachas y la termita de la especie *Mastotermes darwiniensis* (Bandi *et al.*, 1995). Tal es la relación existente con sus endosimbiontes que se habla de coevolución, datando su primer contacto hace 140 millones de años (Clark *et al.*, 2003; Lo *et al.*, 2003). Esta evolución convergente da lugar a que las cucarachas sean individuos amoniotéticos, en vez de uricotéticos. Si se estudia el genoma de artrópodos, se observa que, en general pocos genes dan lugar a la

transformación del amoníaco a urea. En cambio, el estudio del genoma de sus endosimbiontes (como son *B. germanica*) pone de manifiesto que aquellas cucarachas que portan bacterias endosimbiontes del género *Blattabacterium* son amoniotélicas. Los millones de años de coevolución dan lugar a un efecto de reducción de genes en el hospedador, ya que parte de los genes que codifican las enzimas necesarias en estas rutas metabólicas son portadas por la bacteria simbiote.

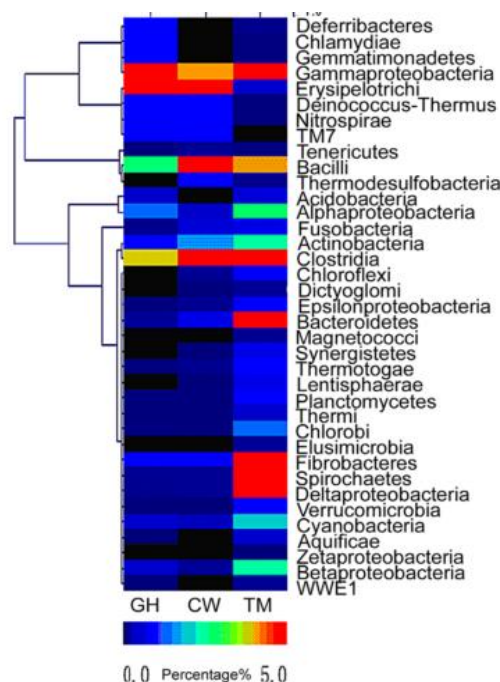


Figura 22: Abundancia relativa de los filos bacterianos de GH, saltamontes (*grasshopper*); CT, oruga (*cutworm*) y TM, termita (*termite*) (Shi *et al.*, 2013).

Por lo tanto, existe una gran variabilidad entre las bacterias que componen la microbiota intestinal entre los diferentes grupos de insectos. Debido a la diversidad de estilos de vida de cada tipo de insecto, y su alimentación variada, no existe una distribución homogénea de los filos bacterianos como sucede en otros tipos de animales (Fig. 22). En la Tabla 3, mostramos cada hospedador en relación al taxón, mayoritario que forma parte de su microbiota intestinal, ya que existen artrópodos cuyas bacterias asociadas al intestino realizan una importante función en el metabolismo nutritivo. Según los múltiples autores consultados, se corrobora que la bacteria con una mayor

abundancia relativa está íntimamente ligada a la alimentación del insecto, y por lo tanto, está involucrada en la adquisición de nutrientes a partir de esa fuente nutritiva.

Tabla 3: Hospedadores y taxones mayoritarios en artrópodos, cuyo ciclo vital está relacionado con el ser humano (modificación de Engel y Moran (2013))

Hospedador	Vía de transmisión	Taxón mayoritario	Fuente de alimentación	Función en el hospedador
Abejas de la miel: <i>Apis</i> spp. <i>Bombus</i> spp.	Social	<i>Snodgrassella alvi</i> , <i>Gillimela apicola</i> , <i>Lactobacillus</i> ssp,	Polen y néctar	Digestión, protección contra parásitos
Termitas: <i>Reticulitermes speratus</i> <i>Nasutitermes</i> spp.	Social	Flagelados, Bacteroidetes, Espiroquetas, Proteobacteria, Firmicutes, Acidobacteria	Madera seca	Aprovisionamiento de nutrientes, reciclaje de nitrógeno, fijación, digestión de la lignocelulosa, fermentación
Saltamontes: <i>Schistocerca gregaria</i>	Comida	<i>Enterococcus</i> , <i>Serratia</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Acinetobacter</i>	Hojas de plantas	Producción de componentes de las feromonas
Mosca de la fruta: <i>Drosophila melanogaster</i>	Comida	<i>Lactobacillus</i> spp., <i>Acetobacteraceae</i> , <i>Orbaceae</i>	Fruta caída	Sistema inmune, metabolismo
Polilla: <i>Lymantria dispar</i>	Comida	<i>Pseudomonas</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Pantoea</i> , <i>Serratia</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Bacillus</i>	Hojas de plantas	Podría estar relacionado con la susceptibilidad de una toxina que afecta a la permeabilidad del epitelio intestinal
Pulgón: <i>Acysthosiphon pisum</i>	Ambiente	<i>Staphylococcus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Pantoea</i>	Floema	Probablemente es patogénica ya que produce componentes de señalización para atraer a predadores de los pulgones

3.3. Aplicaciones de la microbiota intestinal.

El aprovechamiento por parte del hombre de los microorganismos del intestino para suplementar dietas, obtener una homeostasis en el intestino o tratar enfermedades ha estado en el foco de la industria alimentaria y de la medicina mucho tiempo. Más allá del beneficio para la salud, se ha podido comprobar que ciertos microorganismos son eficaces para el control de las especies de insectos considerados plagas. Estos insectos, que por su ecología afectan negativamente a la salud, a los intereses económicos y a la calidad ambiental funcionan como vectores de microorganismos patógenos causando enfermedades severas a los humanos, animales y plantas.

Las enfermedades transmitidas por insectos más importantes son el dengue y la malaria. Según la Organización Mundial de la Salud, sólo en 2011 (Chang, 2011), se diagnosticaron 174 millones de personas infectadas de las cuales murieron 655.000 personas. En el caso del dengue, se han realizado exitosos estudios con dos tipos de mosquitos de la especie *Aedes aegypti* a los que se les ha modificado la microbiota con el simbionte intracelular *Mel Wolbachia* (Hoffmann *et al.*, 2011). Esta bacteria suprime la transmisión de dengue y además acorta el ciclo de vida de los insectos infectados, por lo cual limita mucho su capacidad como posibles vectores de enfermedades.

Además, también hay que señalar que los insectos pueden ser una plaga en la agricultura, dañando la mayoría de las plantas de grano. En torno a la mitad de la producción de este tipo de plantas se pierde debido a la actividad de los insectos que se alimentan de ellas o que son vectores de patógenos de plantas (Oerke, 2006). Usadas como pesticidas naturales encontramos las bacterias *Bacillus thuringiensis*, *Photrhabdus luminescens*, y *Xenorhabdus nematophilus*, ya que sus genes codifican toxinas insecticidas. En el caso de la biotecnología, destaca *B. thuringiensis*, por haberse introducido genes de esta bacteria a las plantas de grano como son el maíz, la soja y a otros tipos de plantas como es el algodón (Christou *et al.*, 2006; Sanahuja *et al.*, 2011).

Otro ejemplo del uso de las bacterias de la microbiota intestinal en el manejo de plagas es la mosca de la fruta mediterránea (*Ceratitis capitata*). Este insecto ataca

primordialmente a las frutas, pero también a otros vegetales que son de interés en la agricultura. Para poder controlar el crecimiento de la mosca, y poder así controlar las enormes pérdidas económicas que conllevaba la plaga, se esterilizaron machos de *C. capitata* por medio de radiación. Los machos ya no eran sexualmente tan atractivos para las hembras y, además, tenían mayor tasa de muerte que los machos irradiados, por lo que la población disminuyó. El estudio de la microbiota intestinal de las moscas aportó datos interesantes como que los machos estériles tenían mayor proporción de *Pseudomonas sp.* y relativamente poca presencia de *Klebsiella sp.*, (Ben Ami *et al.*, 2010). Por ello, se ideó una alimentación para los machos irradiados enriquecida con *Klebsiella oxytoca* como probiótico (Gavriel *et al.*, 2011). El resultado fue que aumentó su competitividad sexual y además disminuyó la tasa de muerte por lo que se observa una relación directa entre la competencia sexual y la presencia de esta bacteria en la microbiota intestinal.

Hay un interés creciente en las abejas y los himenópteros del género *Bombus sp.* puesto que son polinizadores. Estas poblaciones en los últimos años están disminuyendo por una combinación de factores, incluyendo el estrés ambiental, la falta de recursos alimentarios y el uso de insecticidas. Además, hay un síndrome que se conoce como el desorden por colapso de la colonia (CCD), en las abejas, caracterizado por la rápida desaparición de la abeja adulta. Este proceso se está observando en los Estados Unidos, Europa y Japón (Evans y López, 2004; Genersch, 2010). Una de las características sanitarias de las abejas es una buena microbiota intestinal y por ello, los probióticos son una solución a tal merma en la colonia.. En este caso, la bacteria indicada para hacer frente a estos es la *Paenabacillus larvae*.

4. RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS.

Los antibióticos son agentes quimioterapéuticos que se definen como sustancias químicas, producidas durante el metabolismo de un microorganismo o fabricadas por síntesis, que pueden interferir directamente en la proliferación de los microorganismos a concentraciones toleradas por el hospedador. Por ello, la característica principal es la toxicidad selectiva de los mismos siendo inocuo para el hospedador. Algunos son bacterioestáticos, ya que interfieren en la proliferación inhibiendo el crecimiento de los microorganismos. Otros, son bacteriocidas, causando una acción letal irreversible sobre el microorganismo. Actualmente se conocen más de 5.000 antibióticos.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 200 (Brundtland) la resistencia a los antibióticos era un problema complejo por múltiples factores y cuya diseminación causaba un problema al uso de estas sustancias como agentes terapéuticos, puesto que dejan de ser efectivas. Desde entonces este problema ha ido *in crescendo*. En el año 2012, la OMS emitió un informe, *The evolving threat of antimicrobial resistance: options for action* (Grayson) donde planteaba la urgencia de abordar el tema ya que cada vez son más las bacterias que poseen resistencia, o incluso multirresistencias a antibióticos. En el año 2014, la OMS ha puesto de manifiesto que las resistencias a antibióticos hacen peligrar los Objetivos de Desarrollo del Milenio, en el ámbito de la salud. La creciente resistencia a los antibióticos amenaza la sostenibilidad de la respuesta de salud pública a muchas enfermedades transmisibles, en particular la tuberculosis, la malaria y el sida (134ª Reunión, punto 10.6: *La lucha contra la resistencia a los antimicrobianos incluida la resistencia a los antibióticos*, OMS).

Descubrimiento de los antibióticos.

Anterior al uso de los antibióticos, el científico Paul Ehrlich (1901) observó la toxicidad selectiva de ciertas sustancias sobre las bacterias sin perjuicio de las células eucariotas. De la época son sustancias como el salvarsán, derivado del arsénico que se usaba para tratar enfermedades infecciosas como la sífilis.

Pero no fue hasta el año 1928 que Alexander Fleming descubrió de manera fortuita la penicilina, sintetizada por un moho (*Penicillium notatum*) y que inhibía el crecimiento de *Staphylococcus aureus*. Sin embargo, fue en el año 1939 cuando se desarrollaron los métodos de análisis y la producción a gran escala, ocasionado por la gran preocupación existente por las infecciones sufridas por los soldados en la II Guerra Mundial. A partir de entonces, la industria farmacéutica se desarrolló ampliamente en un esfuerzo por encontrar más sustancias antibióticas sintetizadas por bacterias cuyo origen estuviera en el ambiente. Para ello, se caracterizaron sustancias puras y también derivados: beta-lactámicos, aminoglucósidos, tetraciclina, macrólidos, etc.. De este modo, se redujo de forma potencial la mortalidad tanto infantil como de adultos y poco a poco se fue introduciendo en sanidad animal el uso de sustancias antimicrobianas (Fig. 23).

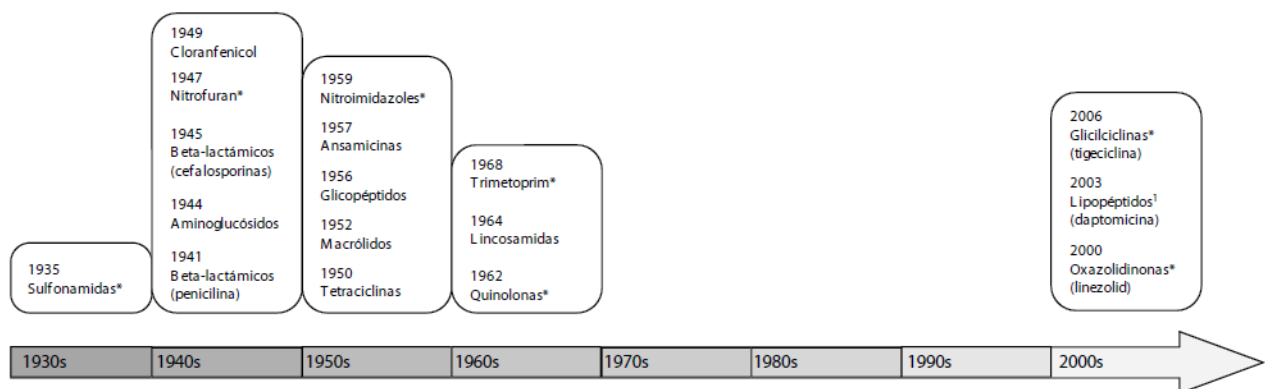


Figura 23: Desarrollo de nuevas familias de antibióticos desde 1935 hasta la fecha (Torres Manrique, 2012)

Según la Sociedad Americana de Enfermedades Infecciosas (IDSA, *Infectious Diseases Society of America*), la síntesis de nuevas sustancias ha disminuido de forma significativa, siendo sólo de dos nuevas sustancias en el periodo 1983-1987 de 16 y en el periodo 2008-2012. El motivo de la disminución del desarrollo de nuevas familias de antibióticos es la búsqueda de nuevas sustancias, aquellas que no generen resistencias, de acuerdo con el informe de OMS del año 2012.

Mecanismos de acción de los antibióticos.

La acción de los antibióticos afecta a componentes esenciales de la multiplicación celular o a estructuras necesarias para el mantenimiento de la vida, pero mientras que unos inhiben el crecimiento de manera reversible (bacteriostáticos), otros causan la muerte celular (bactericidas). Una de las formas más coherentes de clasificar a los antibióticos es de acuerdo a la diana molecular sobre la que actúan. Con este criterio, Edwards (1980) establece cuatro grupos de mecanismos:

1.- *Inhibidores de la síntesis de la pared celular.* Los antimicrobianos actúan interfiriendo con diversos pasos de la biosíntesis del peptidoglicano de la pared celular, bien intracelularmente como la fosfomicina y la D-cicloserina, o bien extracelularmente como ocurre con los β -lactámicos que interaccionan con las proteínas encargadas del ensamblaje de este polímero.

2.- *Inhibidores de la síntesis proteica.* Su diana de acción son los ribosomas, de manera que la unión a este orgánulo produce una parada en la traducción, inhibiéndose la síntesis proteica. La interferencia puede producirse con la subunidad ribosómica 30S (aminoglicósidos y tetraciclinas) o con la subunidad 50S (cloranfenicol, macrólidos, lincosamidas y oxazolidinonas).

3.- *Inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos.* Los antibióticos de esta clase inhiben componentes esenciales que participan en la síntesis de los ácidos nucleicos. Por ejemplo, las quinolonas actúan inhibiendo la acción de las enzimas topoisomerasas II y IV, que controlan el superenrollamiento y desenrollamiento del ADN, y la rifampicina inhibe a la ARN polimerasa, impidiendo la formación de nuevo ARN.

4.- *Antibióticos que afectan a la membrana celular.* Los antibióticos de este grupo afectan a la organización estructural de la membrana celular, desorganizándola o aumentando su permeabilidad. Antibióticos característicos de este grupo son la polimixina E o la colistina.

Davies y Davies (2010) resumieron el desarrollo de los agentes antimicrobianos a lo largo del tiempo, atendiendo al tipo de antibiótico, su diana de acción y el mecanismo de resistencia que produce en las bacterias a las que va dirigida tal quimioterapia (Tabla 4). El éxito del uso de cualquier agente quimioterápico depende del desarrollo potencial de tolerancia o resistencia a alguno de los componentes a lo largo del tiempo que es usado. Esto sucede en los agentes usados para los tratamientos de bacterias, hongos, parásitos e infecciones virales así como para otro tipo de enfermedades crónicas como cáncer y diabetes. Se estudia la existencia de mecanismos bioquímicos y fisiológicos de resistencia a estos compuestos quimioterápicos, aunque aún se necesita una investigación más exhaustiva para entender los complejos procesos que se atribuyen a la emergencia y diseminación de las resistencias antibióticas. El fin último de este proceso es la prevención de resistencias y el control de su desarrollo.

La aparición de mecanismos de resistencia a antibióticos no se debe exclusivamente a su uso en la clínica, tanto médica como veterinaria. Existen otros motivos que han dado lugar a que toneladas de antibióticos fueran usados y puestos en contacto con los agentes patógenos como puede ser la producción animal. En la industria, lo importante es la producción rápida y a un coste que sea beneficioso para el productor, por lo que se empezaron a usar a niveles subclínicos de antibióticos para fomentar el crecimiento de los animales usados para la alimentación. Hecho que ha contribuido a que el medio ambiente se sature de estos agentes, creando una presión selectiva sobre las bacterias ambientales que han ido desarrollando mecanismos de resistencia que garantizaban su supervivencia.

Siendo más precisos, el uso de antibióticos de uso frecuente en medicina y en veterinaria ha resultado en un incremento de la prevalencia de cepas bacterianas resistentes a antibióticos (Kummerer *et al.*, 2004; Levy *et al.*, 2002 (a y b); Salyers *et al.*, 2002; Witte *et al.*, 1998). El descenso de la efectividad de los antibióticos en infecciones es más difícil y tiene un coste económico mayor (Hall, 2004). Además, desde 2006 la Unión Europea está controlando el uso como promotores del crecimiento, como avoparcina, bacitracina, espiramicina, tilosina, y virginamicina.

Tabla 4: Antibióticos y tipos de resistencias en bacterias (modificada de Davies y Davies, 2010).

Tipo de antibiótico	Ejemplo	Diana	Tipo de resistencia
Lactámicos	Penicilinas (ampicilina), cefalosporinas, penemas (meropenema), monobactamas (aztreonam)	Biosíntesis de peptidoglicanos	Hidrólisis, eflujo, diana alterada
Aminoglicósidos	Gentamicina, estreptomina, espectinomicina	Traducción	Fosforilación, acetilación, nucleosilación, eflujo, diana alterada
Glicopéptidos	Vancomicina, teicoplanina	Biosíntesis de peptidoglicanos	Reprogramación de la biosíntesis de peptidoglicanos
Tetraciclinas	Minociclina, tigeciclina	Traducción	Monooxigenación, eflujo, diana alterada
Macrólidos	Eritromicina, azitromicina	Traducción	Hidrólisis, glicosilación, fosforilación, eflujo, diana alterada.
Lincosamidas	Clindamicina	Traducción	Nucleosilación, Eflujo, diana alterada
Estreptograminas	Synercid	Traducción	C-O liasa (estreptograminas de tipo B), acetilación (estreptograminas de tipo A), Eflujo, diana alterada
Oxazolidinonas	Linezolid	Traducción	Eflujo, diana alterada
Fenicolas	Cloramfenicol	Traducción	Acetilación, eflujo, diana alterada
Quinolonas	Ciprofloxacino	Replicación del ADN	Acetilación, eflujo, diana alterada
Pirimidinas	Trimetropim	C1 metabolismo	Eflujo, diana alterada
Sulfamidas	Sulfatoxazol	C1 metabolismo	Eflujo, diana alterada
Rifamicinas	Rifampina	Transcripción	ADP ribosilación, eflujo, diana alterada
Lipopéptidos	Daptomicina	Membrana celular	Diana alterada
Péptidos catiónicos	Colistina	Membrana celular	Eflujo, diana alterada

4.1. Resistencia a antibióticos en la microbiota ambiental.

El uso intensivo y no correcto de los antibióticos en la práctica clínica y en la producción animal da lugar a mecanismos de resistencia en las bacterias. De forma natural estos compuestos son producidos por las bacterias para inhibir el crecimiento de las demás bacterias (Waksman y Woodruff, 1940; Benveniste y Davies, 1973).

Las bacterias que colonizan el medio ambiente, a excepción de las ubicuas, no suelen estar asociadas a infecciones aunque existen excepciones en individuos inmunodeprimidos, donde adquieren el papel de bacterias oportunistas (Quinn, 1998; Gaynes y Edwards, 2005). El origen de estas bacterias se encuentra en el medio

ambiente y son menos susceptibles a los antibióticos (Hancock, 1998; Quinn, 1998; Hancock y Speert, 2000; Ferrara, 2006, Martínez *et al.*, 2009 b). Un ejemplo son las bacterias pertenecientes a la especie *Pseudomonas aeruginosa* en cuyo cromosoma hay genes que dan lugar a una bomba de eflujo a diferentes antibióticos (del inglés Multidrug Efflux Pump, MDP) o el gen *ampC* beta-lactamasa que contribuye a un fenotipo de resistencia (Bonomo y Szabo, 2006). Esto indica que estos determinantes son elementos muy antiguos y, al estar en cada uno de los subtipos de esta especie, se puede concluir que se adquirieron hace cientos de miles de años.

En el medio ambiente se han propuesto otras funciones de los antibióticos, además del ya mencionado. Algunos tipos de antibióticos podrían ser excretados en pequeñas cantidades con el propósito de funcionar como molécula de señalización extracelular. Algunas bacterias poseen receptores de superficie y en contacto con los antibióticos se inicia una cascada intracelular alterando la transcripción del cromosoma (Yim *et al.*, 2006; Fajardo y Martínez, 2008). Además, algunas moléculas cuya función primordial es la señalización se caracterizaron por una dualidad en su función ya que, además, poseen una función antimicrobiana (Kaufmann *et al.*, 2005). Incluso se tiene la duda razonable de no conocer la función primaria de aquellos genes que son los responsables de la resistencia y que están más extendidos. Esto sería el caso de las beta-lactamasas, tuvieron su origen en proteínas de unión a penicilina y estaban implicadas en la síntesis de peptidoglicanos (Meroueh *et al.*, 2003). Las familias de antibióticos sintéticos como las quinolonas se empezaron a usar a mediados de los 60 y son el sustrato favorito para las MDR (Alonso, 1999).

La resistencia de las bacterias a los antibióticos puede estar mediada por vectores como los insectos. Son animales de vida libre que, por tanto, tienen acceso a muchas superficies y que están en contacto directo con animales y personas de forma constante. Insectos como las moscas domésticas (*Musca domestica* L.) están continuamente transportando material orgánico y podrían además transportar incluso a través de la microbiota, bacterias resistentes a antibióticos. El hábitat en el que se desarrolla, su dependencia de la comunidad microbiana, su mecanismo de regurgitación y su capacidad para volar largas distancias le hacen candidato idóneo para la

diseminación de bacterias intestinales, algunas de ellas resistentes a antibióticos (Alam y Zurek, 2004; Graczyk *et al.*, 2001). Otros insectos como los escarabajos, por ejemplo los que se alimentan del estiércol, podrían tener un papel importante como vectores potenciales de genes de resistencia, ya que están en contacto íntimo con las heces y, por consiguiente, con las bacterias del intestino y otros patógenos como protozoos (Mattison y Dictrich, 1999) o nemátodos (Gottlieb *et al.*, 2011). Al tener esa relación tan íntima hospedador/patógeno podrían dar lugar a la dispersión de las resistencias por medio de la dispersión de bacterias que poseen determinantes de resistencia o bien que sean productoras de grandes cantidades de antibiótico, factor que puede ser motor de una gran presión adaptativa.

4.2. Resistencia intrínseca a antibióticos.

Esta resistencia es la que presentan los microorganismos productores de antibióticos como autodefensa frente a su efecto inhibidor. Se incluye, además, la resistencia de los microorganismos resistentes a los que no afectan determinados antibióticos, sin que ello conlleve ningún tipo de alteración. La ausencia de la diana molecular de acción es una clara forma de resistencia intrínseca. Así por ejemplo, la resistencia a vancomicina de muchas especies de *Lactobacillus* y *Leuconostoc* es consecuencia de la ausencia del dipéptido D-alanina-D-alanina que en estos microorganismos se sustituye de forma natural por D-alanina-D-lactato (Elisha y Courvalin, 1995).

La resistencia a antibióticos se ha considerado dirigida por la presión selectiva de los mismos antibióticos sobre las bacterias. Las bacterias del medio ambiente, donde la concentración de antibióticos es baja no deberían tener, entonces, resistencia a estos mismos. Cases (2003) estudió el genoma de estas bacterias ambientales y observó que presentaban genes que les permitía colonizar numerosos tipos de medios. Dentro de estos genes se encontraban aquellos relacionados con enzimas degradativas que podrían estar implicadas en la degradación de los antibióticos como fuente de nutrientes. Gracias a esta resistencia intrínseca, las bacterias pueden estar dentro de hábitats como la rizosfera, que se caracteriza por tener una alta concentración de

sustancias tóxicas sintetizadas por las plantas o por la microbiota comensal (Matilla *et al.*, 2007), por lo cual también pueden estar involucrados en la resistencia a antibióticos (Tamae *et al.*, 2008).

4.3. Resistencia adquirida.

En contraste con la resistencia intrínseca que es anterior al uso de los antibióticos de forma masiva, la resistencia adquirida es un evento reciente, ya que se generó a partir del uso de los antibióticos por el ser humano, y se debe fundamentalmente a su uso excesivo (Martínez, 2009) (Fig. 19). Datta (1983) observó que las familias de plásmidos presentes en enterobacterias antes y después del uso de los antibióticos eran iguales, pero lo que variaba era la adquisición de genes de resistencia de los mismos por parte de las bacterias (Fig. 24).

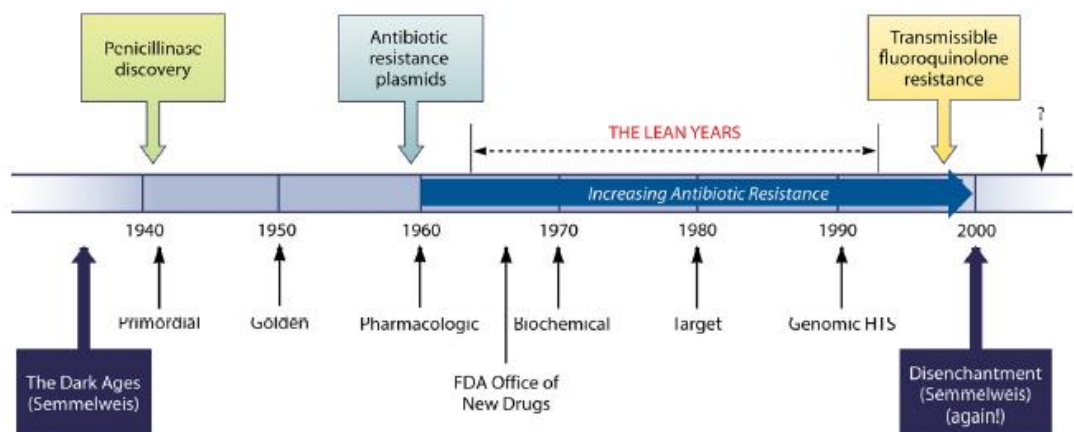


Figura 24: El desarrollo de las resistencias a antibióticos está ligada al desarrollo de nuevas sustancias quimioterapéuticas a lo largo de la Historia (desde 1939 hasta la fecha) (Davies y Davies, 2010).

La relación entre el uso de antibióticos y el aislamiento de bacterias resistentes ha sido puesta de manifiesto por diversos autores (Barbosa y Levy, 2000; Granizo *et al.*, 2000; Bronzwaer *et al.*, 2002). De este modo, la introducción de nuevos antimicrobianos va seguida de la aparición de microorganismos resistentes. De hecho, la aparición de las primeras cepas resistentes de *Staphylococcus aureus* a penicilina G se detectaron tras

un breve periodo de utilización del antibiótico en el año 1944. En 1970, la mayoría de los aislados clínicos de *S. aureus* eran resistentes a este antibiótico.

De modo inverso, el abandono del empleo de un antibiótico va acompañado de una reducción significativa de microorganismos resistentes al mismo (Aarestrup *et al.*, 2001). En el caso de cepas de *S. aureus* se ha constatado que el desarrollo de multirresistencias se produce en los tres años siguientes al contacto con un nuevo antibiótico (DeLeo y Chambers, 2009).

Esto es debido a la adquisición de genes de resistencia como es el gen de la panton-valentina leucocidina, y se ha comprobado que el proceso se controla por sistemas regulados de señalización (Novick y Geisinger, 2008).

4.3.1. Mecanismos de resistencia a antibióticos.

Los genes de resistencia a antibióticos poseen una información codificada en el material genético que confiere resistencia a los antibióticos a la bacteria portadora (Kumarasamy *et al.*, 2010). Los antibióticos deben alcanzar la diana de acción, a una concentración suficiente y un tiempo adecuado, para inhibir o producir la muerte de la bacteria. Por lo tanto, las bacterias usan mecanismos que les aportan una resistencia intrínseca:

- 1) Reducir la concentración intracelular del antibiótico: produciendo interferencia en el transporte de la droga a través de la membrana (impermeabilidad) o por bombas de extracción que pueden transportar los fármacos hacia el exterior de la célula (eflujo).
- 2) Inactivar de modo enzimático al antimicrobiano, por lo que lo modifican o inactivan.
- 3) Modificar rutas metabólicas (*by-pass*).
- 4) Modificar el sitio receptor de la droga, por lo que pueden modificar su pared celular o membrana haciéndola impermeable a la entrada del antibiótico (cambios en la conformación de porinas, ribosomas, proteínas de unión a penicilina).

5) Modificar la diana de acción del antibiótico, de tal manera que este compuesto no pueda ejercer su acción inhibitoria.

6) Expulsar el antibiótico al exterior de la bacteria, a través de la actuación de unas bombas de eflujo, que lo eliminan fuera de la célula.

El estudio de las resistencias a antibióticos ha ayudado a conocer estructuras y funciones celulares, además de entender el mecanismo de resistencia a estos agentes quimioterapéuticos. La búsqueda de las causas de la supervivencia, ha llevado consigo el conocimiento de mecanismos intracelulares exclusivos o bien procesos relacionados con otras funciones. El motor de estos procesos lo constituyen las proteínas, tanto enzimáticas como estructurales. Por consiguiente, se ha comprobado que muchos de esos genes se transcriben de modo constitutivo (Gniadkowski, 2008).

Estos procesos están bien definidos y ampliamente distribuidos entre comensales y patógenos, la mayoría de ellos se dispersan por uno, o más mecanismos de transferencia de genes.

La resistencia a antibióticos se transmite entre las diversas poblaciones bacterianas dando lugar a una resistencia que antes no tenía, dando lugar a que especies bacterianas que eran sensibles hoy sean resistentes. Los mecanismos de transmisión de resistencia más generales son:

- Transmisión horizontal de genes de resistencia.
- Integrines.
- Formación de biopelículas.

4.3.1.1. Transmisión horizontal de genes de resistencia.

El tipo de elementos que se relacionan con la adquisición de resistencia depende del género del patógeno y, en principio, las bacterias por sí mismas no son capaces de adquirir los genes de resistencia y promover su transmisión. Puede existir diferencias

entre las bacterias Gram positivas y negativas, sin embargo la transmisión mediada por plásmido es el mecanismo más común (Norman *et al.*, 2009).

Por lo general, la resistencia farmacológica se adquiere por transferencia horizontal de una célula donadora por uno de los mecanismos mencionados. Este tipo de resistencia se extiende con rapidez, por propagación clonal de la cepa resistente o por transferencias subsecuentes hacia otras cepas sensibles (Chambers, 2006). Dentro de los mecanismos de transferencia horizontal (Fig. 25) se encuentran la conjugación, la transducción y la transformación.

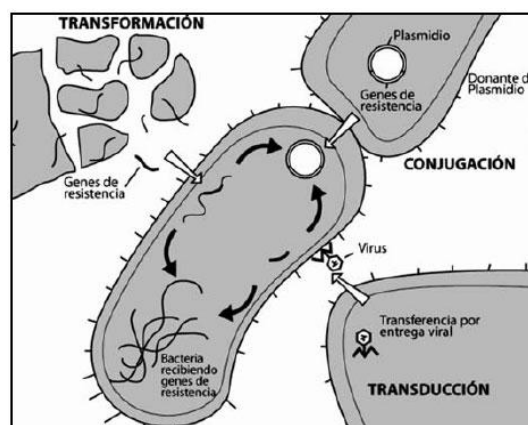


Figura 25: Mecanismos de transmisión horizontal de genes entre bacterias que dan lugar a resistencia a antibióticos (Moreno *et al.*, 2009).

- 1.- La *conjugación* es la transferencia de genes por contacto entre dos células a través de un puente sexual (*pilus*). Este mecanismo es muy importante, puesto que es posible transferir varios genes de resistencia en un solo evento, a través de un plásmido conjugativo (DeLeo, 2009).
- 2.- En la *transducción*, el ADN de la célula donadora penetra en la célula receptora por infección viral. Cuando el ADN posee un gen de resistencia farmacológica, la célula bacteriana recién infectada adquiere esta resistencia (Passerini, 2006).
- 3.- El proceso de *transformación* involucra la captación e incorporación en el genoma de

la bacteria receptora de ADN desnudo liberado en el ambiente por otras células bacterianas (Passerini, 2006).

Existen teorías que indican que se puede relacionar la resistencia a antibióticos con la existencia de bacteriófagos que llevan genes de resistencia, pero raramente han sido aislados en el medio ambiente o en hospitales, en cambio no se cuestiona la relación de los fagos con los mecanismos necesarios de inserción para la formación de elementos móviles de resistencia. Se encuentran con frecuencia flanqueando a los genes de resistencia en diferentes vectores. La transmisión por conjugación se ha observado en los tractos intestinales de animales y humanos (Shoemaker *et al.*, 2001) y se ha podido constatar con el avance en el conocimiento de la metagenómica asociada al intestino, donde se han podido encontrar estos genes (Sommer *et al.*, 2009).

En el caso de *Streptococcus*, *Meningococcus* y géneros relacionados, el intercambio de genes de virulencia y patogenicidad es altamente promiscuo debido a los procesos de transformación (Feil *et al.*, 1998; Hakenbeck, R., 1998; Springman *et al.*, 2008). En bacterias del género *Acinetobacter* spp. se producen intercambio de genes, encontrándose fundamentalmente en amplias islas genómicas (Liebert *et al.*, 1998; Pérez *et al.*, 2007).

4.3.1.2. Integrones.

Los integrones son una familia de elementos genéticos potencialmente móviles capaces de integrar y expresar genes de resistencia a los antibióticos, fueron identificados por Stockes y Hall en 1987. Los integrones han sido detectados principalmente en bacilos Gram negativos fermentadores, de las familias *Enterobacteriaceae* y *Vibrionaceae*, y en algunos no fermentadores, como *P. aeruginosa* y *A. baumannii* (González *et al.*, 2004).

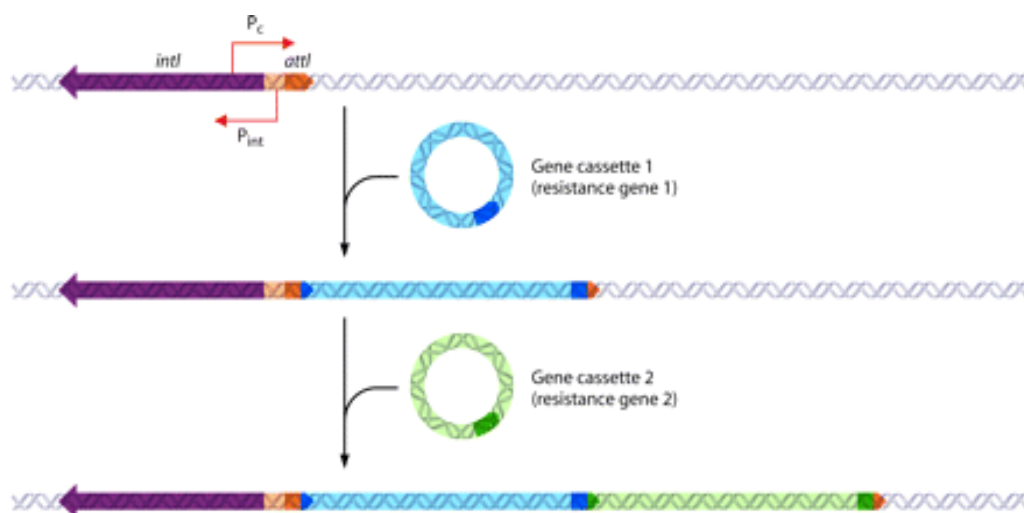


Figura 26: Representación de un integrón con sus tres componentes fundamentales: *intI*, *P* y *attI* y el mecanismo de integración de los genes dentro de su estructura. De ese modo, se produce la transferencia de la resistencia a antibiótico entre las diferentes bacterias

Los integrones, en su forma más sencilla, están formados por tres elementos necesarios para la captura y expresión de genes exógenos (*cassetes*) (Stockes y Hall, 1995). Tales genes codifican una integrasa (*intI*), el otro es el lugar de recombinación sitio-específico (*attI*) y, por último, un promotor (*P_{ant}*) para la expresión de los genes *cassetes* integrados. A veces contienen un segundo promotor más potente, *P₂* (Fig. 26).

El lugar de recombinación específico *attI* está formado por 65 pares de bases, incluyendo 2 regiones correspondientes a los lugares de unión fuerte y débil de la integrasa, y un lugar de recombinación, en el cual los genes capturados son integrados gracias a la acción de la integrasa *IntI*.

Aunque son poco usuales se asocian a aislados de *Shigella* (Liebert *et al.*, 1999). No son por sí mismos elementos móviles pero pueden llegar a ser, en asociación a una gran variedad de funciones de inserción y de transferencia (Holmes *et al.*, 2003), en especial en el caso de las Gammaproteobacteria (Gillings *et al.*, 2008).

Se sugiere que tanto los integrones como sus *cassettes* de genes juegan papeles importantes en la transmisión de genes de resistencia, tanto en bacterias Gram positivas como negativas. Se han identificado un total de 100 los *cassettes* identificados que se

relacionan con la mayoría de los tipos de antibióticos (Rechia y Hall, 1995). En el medio ambiente, que alberga desde hospitales, medio rural, plantas de tratamiento de aguas residuales, etc. mediante amplios estudios metagenómicos se han descrito multitud de integrones asociados, o no, con la resistencia. La secuencia de los integrones sugiere que existe una relación, probablemente por coevolución, de integrones y fagos.

4.3.1.3. Formación de biopelículas.

Otros mecanismos de resistencia desarrollados involucran la formación de biopelículas o biofilms (Fig. 27). Las biopelículas son capaces de adherirse a superficies y conforman comunidades de bacterias, con fenotipos heterogéneos, dentro de una densa matriz polimérica. La alta densidad de la matriz obstaculiza la penetración de los antibióticos por difusión. Esto se complementa con la heterogeneidad fenotípica de la comunidad (al contar con bacterias en crecimiento, bacterias que no están creciendo, bacterias en estado estacionario y bacterias en estado latente), debido a que la eficiencia bactericida de los antibióticos en bacterias en crecimiento es de varios órdenes de magnitud menor a la de los otros tres estados. Inclusive las bacterias persistentes, o bacterias en estado latente, son inmunes a los antibióticos actuales. Al no existir un acceso a las bacterias se dificulta el tratamiento, por lo cual son estas bacterias las principales causantes de las infecciones recurrentes (Smith y Romesberg, 2007; Shah *et al.*, 2006; Lewis, 2007). Este tipo de mecanismo da resistencia a bacterias que de forma normal son sensibles, ya que se asocian a bacterias formadoras de biopelículas imposibilitando el acceso del antibiótico.

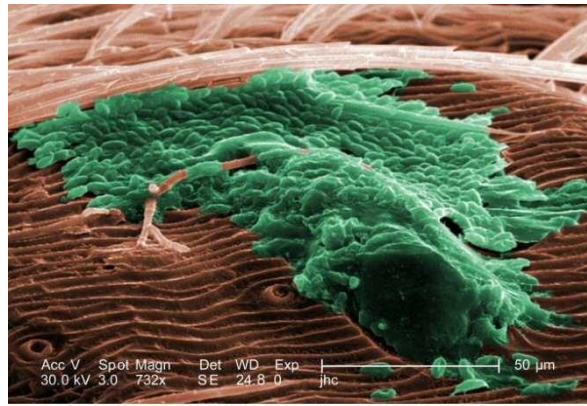


Figura 27: Biopelícula de bacterias tomada mediante un microscopio electrónico de barrido (perteneciente al Centre of Diseases Control, CDC).

4.4. Resistencia antibiótica y microbiota intestinal.

La transmisión de los factores de resistencia a bacterias que son ambientales origina una modificación que resulta en la conversión en patógenos oportunistas, causando enfermedades en humanos y animales cuyo sistema inmune se ve comprometido. En los ambientes hospitalarios es normal encontrar bacterias resistentes a muchas familias de antibióticos, debido a la presencia de los genes de resistencia. De este modo, han surgido cepas que son multirresistentes y que son responsables de graves infecciones difíciles de tratar (Baquero, 1997; Williams, 2001).

Estos factores de resistencia también se encuentran en aquellas bacterias ubicuas que también colonizan la pared del intestino (Fig. 28) y que poseen un papel importante en el hospedador. El problema que existe es que podrían actuar como reservorio de genes de resistencia a antibióticos y que el simple contacto con otras bacterias oportunistas o patógenas pudiera transmitir los determinantes, dando lugar a la difusión de las resistencias (Teuber *et al.*, 1999; Salyers *et al.*, 2004).

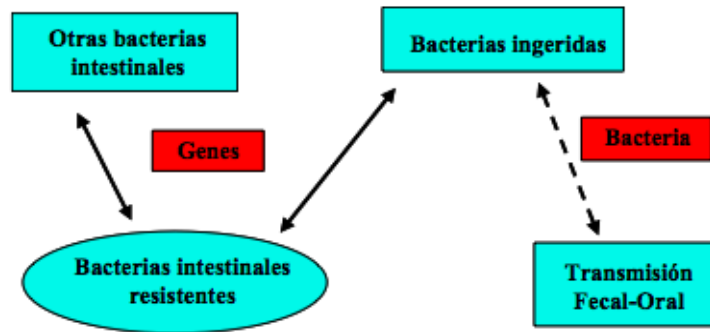


Figura 28: Hipótesis de la extensión de la resistencia. Las bacterias portadoras funcionan como reservorios de los determinantes de resistencia. Este tipo de hipótesis se puede hacer extensible a las bacterias que son ubicuas en el intestino, dando lugar a que produzcan patogenias en individuos con el sistema inmune debilitado.

OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

OBJETIVOS

Thorectes lusitanicus es un escarabajo endémico de la Sierra de los Alcornocales (Cádiz) que se considera particular por su dieta, puesto que alterna heces y bellotas de *Quercus* a lo largo de ciclo vital. Desde el punto de vista ecológico, tiene un importante papel como diseminador de las semillas de *Quercus ilex* y *Q. canariensis* dando lugar al equilibrio y la regeneración del ecosistema donde habita. Se ha observado que la alternancia de la dieta produce cambios fisiológicos siendo una incógnita el efecto que supone en la microbiota intestinal. Actualmente, el análisis de la microbiota intestinal tiene una gran relevancia, ya que sus microorganismos poseen características metabólicas concretas para la utilización de nutrientes externos. Por ello, la alternancia de dietas podría suponer una alternancia en la composición de microorganismos.

El conocimiento que tenemos de la microbiota intestinal de los coleópteros y sus funciones es limitado. Por ello, se planteó como objetivo principal de la presente Tesis Doctoral analizar la diversidad genética de la microbiota intestinal de *T. lusitanicus*.

Con este fin, se desarrollaron los siguientes objetivos concretos:

- Analizar la microbiota intestinal de *Thorectes lusitanicus* aplicando diferentes técnicas usadas en microbiología, dependientes de cultivo bacteriano.
- Investigar la relación simbiótica existente entre el escarabajo y las bacterias de la microbiota intestinal para conocer las funciones que desempeñan las bacterias y el beneficio que el escarabajo obtiene de tal relación.
- Analizar la microbiota intestinal de *T. lusitanicus* usando técnicas de biología molecular y secuenciación masiva en dos poblaciones diferenciadas para conocer el efecto de la dieta y las diferencias existentes en la abundancia y diversidad de especies bacterianas.

- Examinar las diferentes funciones que podrían tener las bacterias de la microbiota intestinal de *T. lusitanicus*, con el fin de obtener un beneficio para el medio ambiente y su posible utilización en la biorremediación.
- Estudiar la función de *T. lusitanicus* como posible vector potencial implicado en la transmisión de genes de resistencia antibiótica y/o enfermedades infecciosas, con importancia en Sanidad Animal y Salud Pública.

TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN

CAPÍTULO I

Culturable aerobic, facultative anaerobic, and aerotolerant bacteria from the gut of the polyphagic dung beetle *Thorectes lusitanicus* Jeckel

Noemi Hernández, José Antonio Escudero, Álvaro San Millán, Bruno González-Zorn, Jorge. M. Lobo, José R. Verdú, Mónica Suárez

Artículo publicado en la revista *Insect Science*

Resumen

Thorectes lusitanicus, a diferencia de otros escarabajos pertenecientes a los Geotrupidae, que se alimentan de heces y demás desperdicios posee un comportamiento polífago, que le permite alimentarse de bellotas, hongos, frutas además de las heces de diferentes mamíferos de la zona en la que habitan. La adaptación fisiológica a la digestión de tan diversa dieta y el desarrollo de ventajas adaptativas requiere importantes cambios en la composición y diversidad de la microbiota intestinal. En este estudio se aislaron bacterias aerobias y anaerobias facultativas y microaerófilos del intestino del escarabajo y que fueron capaces de poder crecer en placa y se identificaron a nivel de especies por medio de la secuenciación de fragmentos del gen 16S *rRNA* que se asocia a la subunidad menor del ribosoma bacteriano. Gracias al uso de bases de datos de genes, en este caso BLAST, se compararon las secuencias obtenidas por similitud y máximo parentesco filogenético, por lo cual se pudo determinar que las bacterias provenientes, y cultivables, de la microbiota intestinal del escarabajo predominantemente son los filos Proteobacteria, Firmicutes y Actinobacteria. Entre las Proteobacteria, miembros del orden de las Enterobacteriales (Gammaproteobacteria) fueron las más abundantes. Las funciones principales asociadas con las bacterias encontradas en el intestino probablemente sean la fijación de nitrógeno, desnitrificación, detoxificación y la defensa frente a la entrada de otras bacterias que pudieran ser patógenos.

Abstract

Unlike other dung beetles, the Iberian geotrupid *Thorectes lusitanicus* exhibits polyphagous behavior; for example, it is able to eat acorns, fungi, fruits, and carrion in addition to the dung of different mammals. This adaptation to digest a wider diet has physiological and developmental advantages and requires key changes in the composition and diversity of the beetle's gut microbiota. In this study, we isolated aerobic, facultative anaerobic, and aerotolerant microbiota amenable to grow in culture from the gut contents of *T. lusitanicus* and resolved isolate identity to the species level by sequencing *16S rRNA* gene fragments. Using BLAST similarity searches and maximum likelihood phylogenetic analyses, we were able to reveal that the analyzed fraction (culturable, aerobic, facultative anaerobic, and aerotolerant) of beetle gut microbiota is dominated by the phyla Proteobacteria, Firmicutes and Actinobacteria. Among Proteobacteria, members of the order Enterobacteriales (Gammaproteobacteria) were the most abundant. The main functions associated with the bacteria found in the gut of *T. lusitanicus* would likely include nitrogen fixation, denitrification, detoxification, and diverse defensive roles against pathogens.

Introduction

Digestion is a basic and key process in heterotrophic animals that provides the necessary nutrients to ensure the continuation of vital activities including development, growth, and reproduction. To achieve maximal digestion efficiency, animals have co-evolved complex symbiotic (mutualistic) interactions with gut bacteria (Ventura *et al.*, 2009). The animal gut microbiota develops as an internal ecosystem comprising diverse bacterial species that interact in complex and dynamic ecological networks. This ecosystem includes both persistent residents and transient members introduced from the environment (Lupp and Finlay, 2005). The composition and complexity of gut bacterial communities appear to be species-specific and strongly dependent on environmental (e.g., diet; Turnbaugh *et al.*, 2006; De Filippo *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2011) and host genetic factors (Ley *et al.*, 2005; Benson *et al.*, 2010). Gut bacterial symbionts

provide the host with a broad array of metabolic activities and significantly expand the host digestion spectrum through fermentation of otherwise non-digestible food components (e.g., plant fiber; Dillon and Dillon, 2004; Ley *et al.*, 2005). Importantly, these gut bacteria also seem to be actively involved in the development of some health disorders, prevention of infection by invading pathogens via competition for intestinal receptors, the production of antibiotics, and activation of the host immune system (Ley *et al.*, 2005; Fava *et al.*, 2006; Wen *et al.*, 2008; Kaltenpoth, 2009; Bravo *et al.*, 2011; Colman *et al.*, 2012; Seipke *et al.*, 2012; Waite *et al.*, 2012)

Mammalian gut microbiotas (e.g., ruminants and human) and their collective genomes (i.e., microbiomes) are among those that have been best characterized. While digestion in cattle is accomplished mostly in the foregut (rumen), fermentation in humans mainly occurs in the hindgut (the caecum and mostly in the colon; Stevens and Hume, 1998). Both gut regions show striking differences in their bacterial communities, regardless of the host. In the foregut, a higher representation of Bacteroidetes and Spirochaetes is normally found, whereas Proteobacteria and Firmicutes dominate in the hindgut (Godoy-Vitorino *et al.*, 2012). These differences have been associated with the need for higher cellulolytic activity in the foregut and higher proteolytic activity in the hindgut (Kovatcheva-Datchary, 2009). In humans, the intestinal microbiota is predicted to include up to 400-1000 bacterial species (7000 strains), most of which (80%) are still uncultured (Kovatcheva-Datchary, 2009). Anaerobic genera such as *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus*, *Clostridium* and *Faecalibacterium* are the most abundant (Eckburg *et al.*, 2005; Ventura *et al.*, 2009).

Insects, the most diverse group of live organisms, also host highly diverse hindgut microbial communities (Dillon and Dillon, 2004) that await detailed exploration and description. Thus far, gut symbionts have been described in insect groups with different diets such as xylophagous termites (Warnecke *et al.*, 2007), leaf-cutter ants (Aylward *et al.*, 2012), haematophagous mosquitoes (Gaio *et al.*, 2011), pollenivorous bees (Martinson *et al.*, 2011) herbivorous butterflies (Broderick *et al.*, 2004), or detritivorous beetles (Andert *et al.*, 2010). A recent comparative study using gene sequence data from

58 insect species (Colman *et al.*, 2012) showed that both diet and host taxonomy influence the composition and diversity of gut bacterial assemblages (Mrázek *et al.*, 2008; Schauer *et al.*, 2012). As bacteria are essential sources of enzymes needed in carbohydrate (e.g., plant xylan and cellulose), lignin, pectin, lipid and protein degradation, polyphagous species normally show the largest diversity in their gut bacterial communities when compared with species that feed on specialized diets (Mrázek *et al.*, 2008; Brune and Friedrich, 2000; Suh *et al.*, 2003; Schauer *et al.*, 2012; Gayatri Priya *et al.*, 2012). Among the insects with specialized food habits, xylophagous insects appear to have the richest bacterial gut flora (Colman *et al.*, 2012), but to our knowledge no studies have explored the diversity of gut bacteria of coprophagous insect species.

The flightless dung beetle *Thorectes lusitanicus* (Coleoptera, Scarabaeoidea, Geotrupidae) is an endemic species distributed in the south of the Iberian Peninsula. Although dung beetles are normally involved in the recycling and management of herbivore dung and maintain strict coprophagous habits (Nichols *et al.*, 2008), *T. lusitanicus* exhibits behavior indicating broad trophic ability; it also feeds on acorns, fresh fungi, carrion, and even plant leaves, as its mouthparts are adapted to the consumption of fibrous material and dry dung (Verdú and Galante, 2004). Furthermore, *T. lusitanicus* is attracted to the acorns of at least two oak species (*Quercus suber* and *Q. canariensis*) and acts as a secondary disperser by collecting viable acorns, partially eating them, and burying them in the soil (Pérez-Ramos *et al.*, 2007; Verdú *et al.*, 2007). Due to the high polyunsaturated fatty acid content of these acorns, this diet has allowed *T. lusitanicus* to make important improvements in terms of low temperature resistance and ovarian development (Verdú *et al.*, 2010).

There are several methods currently available for characterizing gut microbiotas, and each present different advantages. Essentially, these methods can be classified into i) those that isolate bacteria from the gut to culture them under controlled conditions (Gayatri Priya *et al.*, 2012) and ii) those that use culture-independent molecular methods, such as PCR amplification of bacterial 16S rRNA genes plus direct sequencing

or high-throughput metagenomic approaches using next-generation sequencing (NGS) techniques (Kovatcheva-Datchary, 2009; Ventura *et al.*, 2009; Qin *et al.*, 2010; Shi *et al.*, 2010). While the latter methods are able to detect less-frequent species and, in particular, those that cannot be cultured, the former methods, although more labor-intensive, have the advantage that isolated bacteria can be further functionally characterized using traditional microbiology tools and are readily available for potential biotechnological applications. Anticipating that many bacterial species would be reported for the first time in our study, we opted to isolate culturable bacteria because this approach is commonly used for insect microbiomes (e.g., Gayatri Priya *et al.*, 2012) and would also enable straightforward characterization of the biological role of isolates of interest (Dillon and Dillon, 2004).

In this study, we describe for the first time the culturable aerobic, facultative anaerobic and aerotolerant bacteria present in the gut contents of a coprophagous insect characterized by the ability to efficiently assimilate a wide variety of food resources: the dung beetle *T. lusitanicus*. Taxonomic identification was achieved through *16S rRNA* gene sequencing followed by comparative sequence analyses. Bacteria were grouped according to their relative phylogenetic position, and the composition of the obtained fraction of the *T. lusitanicus* gut microbiome was compared with those of other insects. In addition, the putative roles of different bacterial species that might aid the polyphagous diet of this dung beetle were suggested.

Materials and Methods

Beetle collection

T. lusitanicus individuals were captured in Los Alcornocales Natural Park in southern Spain in autumn (November 2006). For *T. lusitanicus*, this period coincides with the ingestion of acorns, fungi, madrone fruits and dung (mainly from cattle and red deer). All individuals were maintained in plastic containers at 20°C until their arrival at the laboratory, where they were maintained at 10°C in a climate chamber (with a

temperature similar to the average experienced in the field during autumn) to minimize stress.

Isolation of the culturable, aerobic, facultative anaerobic, and aerotolerant component of the intestinal microbiota.

Culturable, *aerobic, facultative anaerobic*, and aerotolerant bacteria were isolated from the intestinal contents of aseptically removed mid- and hindguts. The intestinal contents of 20 *T. lusitanicus* individuals were pooled, homogenized and vortexed vigorously in nine volumes of sterile water. Serial dilutions were made up to 10^{-6} , and 100 μ l were spread over plates with Brain-Heart infusion (BHI) broth (Biomérieux), which were incubated aerobically at 28°C for 24 hours. Colonies differing in morphology, color, shape and elevation were isolated, streaked on fresh BHI plates, and incubated for 24 hours at 28°C. Two transfers were needed to get pure cultures, which were stored at –80°C in skim milk with 10% (v/v) glycerol.

Isolation of DNA, PCR amplification, and sequencing.

DNA was extracted directly from bacterial colonies either by lysing them with hot sterile water (50 μ l at 100 °C for 10 min) or by using a commercial purification kit (QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen GmbH, Hilden, Germany). One μ l of the total volume of each DNA sample was used as template in a polymerase chain reaction (PCR) to amplify the 16S rRNA gene using two overlapping sets of primers (modified from Baker *et al.* 2003): Ari5 (5'-CTGGCTCAGGACGAACGCTG-3') and E1541R (5'-AGGAGGTGATCCAACCGCA-3') that amplify a fragment of about 1,500 bp covering the whole molecule; and in those cases that the previous set did not work, E8F (5'-AAGAGTTTGATCATGGCTCA-3') and U1115R (5'-GTTGCGCTCGTTGCGGGACT-3') that amplify a shorter fragment of about 1,100 bp. PCR reactions (25 μ l) contained 10 ng of DNA isolated from bacteria, 2.5 μ l (1x) of buffer (MgCl₂ added at 2.5 mM final concentration), 0.5 μ l (0.4 μ M) of each primer, 1 μ l of dNTPs (0.4 mM of each), and 1.5 μ l *Taq* polymerase (1.5 U). The reaction conditions were: 95°C for 10 min, 30 cycles of 60 s at 95°C, 60 s at 52°C, and 120 s at 72°C, and a final extension at 72°C for 10 min.

PCR products were purified using the QIAquick PCR purification kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). Amplification products were analyzed by electrophoresis in 1.5% (w/v) agarose gels containing 1 ng/ml SYBR Safe™ DNA gel stain (Invitrogen, Oregon, USA). Purified PCR products were sequenced at the Sequencing Service of the Centre for Biological Research (CIB-CSIC; SecuGen, SL) using PCR primers with the BigDye® Terminator v. 3.1. kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) following the manufacturer's instructions.

Sequence similarity searches and phylogenetic analysis.

Obtained sequences were edited with Chromas v. 1.4.3 (Faculty of Science, Griffith University, Australia). Dissimilar sequences were deposited in GenBank under accession numbers HQ326781 to HQ326838 and HQ340154 to HQ340156. Sequences were compared against the NCBI database using the BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) tool. Specifically, the program Megablast, which optimizes for highly similar sequences, was selected, and queries were searched against "16S ribosomal RNA sequences (Bacteria and Archaea)." This database includes near full-length 16S ribosomal RNA sequences from more than 250 archaeal and 7200 bacterial strains. The 16S BLAST database is useful for identifying or establishing the taxonomic affinities of unknown bacterial 16S sequences such as those from environmental or organismal samples or metagenomes. Taxonomic identification was based on the percentage of sequence identity scores, and the first ten hits were retained for further analyses.

For phylogenetic analyses, 16S rRNA sequences obtained from the beetle gut microbiota and best-hit sequences retrieved from GenBank were aligned using MAFFT (Katoh and Toh, 2008) at the EMBL-European Bioinformatics Institute site (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/mafft/). Gaps and highly variable portions of the alignment were excluded from phylogenetic analyses taking secondary structure of 16S rRNA into consideration. The trimmed alignment was subjected to maximum likelihood analysis (ML; Felsenstein, 1981) using PhyML (Guindon *et al.*, 2010) at the ATGC bioinformatics platform (www.atgc-montpellier.fr/phyml/). GTR+I+G (I = 0.33; alpha = 0.63) was selected as the best-fit evolutionary model using jmodeltest v. 2.1.1 (Darriba *et al.*,

2012). Support for internal branches was evaluated by performing 100 replicates of non-parametric bootstrapping (Felsenstein, 1985).

Results

Culturing of bacteria from the intestinal contents of *T. lusitanicus* yielded up to 224 phenotypically different colonies. PCR amplification and sequencing of the 16S rRNA genes from these isolates resulted in 56 different DNA sequences (labeled PM; Table 1). Using an arbitrarily defined limit of 99.5% sequence similarity, we could distinguish a minimum of 43 OTUs (operational taxonomic units) that could be ascribed to the corresponding number of species with the BLAST searches and the phylogenetic analysis (see below). On average, the length of the new sequences was 927 bp, with a maximum of 1,510 bp (PM37) and a minimum of 236 bp (PM48). BLAST searches were performed using the newly obtained 16S rRNA gene sequences as queries. In Table 1, the best hit of each search is shown. In general, best hits showed 98-99% identity with their corresponding query sequences, allowing for the direct identification of isolates at the species level (Table 1). In some cases (PM18, PM20, PM43, PM51, PM59, and PM60), the percentage of identity was lower (between 91-94%), which could indicate either new species or higher rates of divergence in a particular group (e.g., *Lactococcus*). According to the BLAST results, the culturable bacteria isolated from the beetle gut were taxonomically highly diverse, comprising 40 Proteobacteria isolates (71%), 10 Firmicutes (18%), and 6 Actinobacteria (11%). Uncorrected *p* distance pairwise comparisons varied between 0.002 and 0.410. Unfortunately, pairwise comparisons involving PM48 and other short sequences, specifically PM1, PM9, PM23, PM31, PM35, PM55, and PM59, could not be estimated because there were no sequence overlaps.

For phylogenetic analyses, a total of 10 best hits per BLAST search were retained. Of the 560 best BLAST hits, a total of 296 were non-redundant. The retrieved non-redundant sequences were aligned with the 56 queries and subjected to ML inference. The initial 16S rRNA alignment was 1,814 positions long. After the removal of ambiguous sites (i.e., those of uncertain positional homology), which mostly occurred at the beginning and end of the sequences and around gapped regions, the length of the final

alignment was 1,480 positions. In this final alignment, a total of 568 positions were constant, and 760 were parsimony-informative sites. The phylogenetic distribution of the bacteria reported in this work is shown in the reconstructed ML tree ($-\ln L = 43923.8$) in Fig. 1. The intestinal microbiota of *T. lusitanicus* could be separated into six distinct main monophyletic groups: Firmicutes (10 PMs), Actinobacteria (6 PMs), Alphaproteobacteria (2 PMs), Betaproteobacteria (8 PMs), Gammaproteobacteria orders Enterobacteriales and Pseudomonadales (29 PMs), and Gammaproteobacteria order Xanthomonadales (1 PM) (Fig. 1). All six main groups received maximal bootstrap support (Fig. 1). The dung beetle intestinal bacteria (PMs shown in red in Fig. 1) were represented by six recovered monophyletic groups, although these were not evenly distributed (only a few species were recovered for Alphaproteobacteria and the order Xanthomonadales of Gammaproteobacteria). The greatest species richness of the *T. lusitanicus* gut microbiome was located within the order Enterobacteriales.

Discussion

Polyphagous insects are able to eat a wide range of food sources to obtain the most favorable nutrients required for their growth, development and reproduction (Redfearn and Pimm, 1988). Moreover, these insects are able to self-select nutritionally optimal diets from their environment, although the ecological and physiological benefits of this behavior remain unknown. In the case of *T. lusitanicus*, the evolutionary shift from coprophagy to a polyphagous diet may be interpreted as a niche enlargement strategy intended to reduce the risks of consuming a fluctuating and ephemeral resource (Verdú *et al.*, 2010). This adaptation provides *T. lusitanicus* with a selective advantage in case of seasonal food shortage, which naturally occurs in the Mediterranean ecosystem (particularly in the southernmost regions such as those inhabited by *T. lusitanicus* in the Iberian Peninsula) and offers additional physiological and developmental advantages capable of improving fitness (Verdú *et al.*, 2010).

Microbial symbioses in the insect gut are known to play a crucial role in facilitating polyphagy in several groups of insects (Cazemier *et al.*, 1997), and thus it was expected that the gut of the polyphagous dung beetle *T. lusitanicus* would harbor a high richness

of bacteria accompanied by a wide and distinct functional capacity (De Filippo *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2011). Indeed, our results confirmed this expectation, showing that culturable bacteria of the gut of *T. lusitanicus* are highly rich in terms of sequence divergence, number of species and taxonomic range. Comparable data for taxonomically related species (Coleoptera, Scarabaeidea) are mainly available for some species with larval guts that possess a fermentation sac able to degrade cellulose (Cazemier *et al.*, 1997). Despite these studies used culture-independent molecular methods that were also able to detect the anaerobic microbiota, the absolute number of different DNA sequences obtained from *T. lusitanicus* could be considered of the same magnitude to those obtained from the herbivorous larvae of *Melolontha melolontha* (90 clones, Egert *et al.*, 2005), *Holotrichia parallela* (21 clones, Huang *et al.*, 2012; 205 clones, Huang and Zhang, 2013), and *Costelytra zealandica* (22 clones, Zhang *et al.*, 2008), as well as those of the detritivorous larva of *Pachnoda ephippiata* (56 clones, Egert *et al.*, 2003) and several xylophagous longicorn beetle species (142 clones, Park *et al.*, 2007). The richness of the *T. lusitanicus* gut microbiota also show similar levels to those that occur in other coleopteran and most other insect groups, except in the case of some xylophagous and detritivorous species, mainly termites (Colman *et al.*, 2012).

According to our results, bacteria constituting the gut community of *T. lusitanicus* coincide with those typically found in soil and plants as well as cattle guts and faeces, a phenomenon that occurs in other polyphagous insects as well (Gayatri Priya *et al.*, 2012), whereas microfloras in the anaerobic guts of specialized insects such as termites are distinct from surrounding free-living bacterial communities because they are dominated by species with fermentative metabolisms (Colman *et al.*, 2012). The number of species representing the three phyla was proportional to the diversity of each phylum in nature, with Proteobacteria being the most abundant (Stackebrandt *et al.*, 1988). Thus, the gut microbiota composition of *T. lusitanicus* should be similar to those of other non-termite or non-pollenivorous hymenopteran insect species (Colman *et al.*, 2012). Clostridiales (Firmicutes) and Bacteroidales associated with a fermentative metabolism have been shown to be prevalent in nearly all termite species as well as in the larval guts of the taxonomically related herbivorous species of Scarabaeidea (Egert *et al.*, 2003; Egert *et al.*, 2005; Zhang and Jackson, 2008; Huang *et al.*, 2012). As in our study, several

studies describing the gut microbiomes of xylophagous (Park, 2007; Stackebrandt, 1988) or other herbivorous Scarabaeidea species (Huang *et al.*, 2012) also reported a high abundance of Proteobacteria. Within the Proteobacteria of *T. lusitanicus*, most genera belonged to the order Enterobacteriales (*Escherichia*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Obesumbacterium*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Providencia* and *Yersinia*) of Gammaproteobacteria, which is widespread in animal hindguts in general (Behar *et al.*, 2008a; Colman *et al.*, 2012) and beetles in particular; for instance, *Rahnella*, *Serratia* and *Yersinia* are abundant in the hindgut microbiome of the Southern Pine beetle *Dendroctonus* (Vasanthakumar *et al.*, 2006), and *Enterobacter* is abundant in the bollworm *Helicoverpa* (Gayatri Priya *et al.*, 2012).

Unfortunately, we could not isolate any species of the phylum Bacteroidetes, which is well represented in some insect (Schauer *et al.*, 2012) and human guts (Turnbaugh *et al.*, 2006). This absence could be related to (1) the fact that they are normally found in the foregut (Godoy-Vitorino, 2012), (2) that they are strictly anaerobic (Gayatri Priya *et al.*, 2012), and (3) low sampling effects. Additionally, we could not find members of the phylum Acidobacteria, which have been described to constitute low proportions in the guts of longicorn beetles (Cerambycidae) with woody diets (Stackebrandt *et al.*, 1988).

Phylogenetic analyses strongly supported monophyly at the phylum level but failed to recover all Gammaproteobacteria orders together. This is not surprising because the phylogenetic position of the order Xanthomonadales is the subject of a long-standing debate (Comas *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2009; Cutiño-Jiménez *et al.*, 2010). Overall current evidence points to a basal position for Xanthomonadales within Gammaproteobacteria, but more studies are needed to discard the potential presence of shared characters between Xanthomonadales and Betaproteobacteria (Cutiño-Jiménez *et al.*, 2010)¶

The bacterial richness found in the *T. lusitanicus* gut should correlate with a wider functional diversity, which would allow the beetle to improve nutrient supplementation with food sources other than herbivore dung (Shi *et al.*, 2010). Although further

observations and specific experiments are needed to confirm this hypothesis, several lines of evidence support it. For instance, Enterobacteriales genera such as *Rahnella*, *Serratia*, and *Enterobacter*, which were found in abundance in the gut of *T. lusitanicus*, have been suggested to be involved in nitrogen fixation (diazotrophy) in the guts of bark beetles of the genus *Dendroctonus* (Vasanthakumar *et al.*, 2006; Morales-Jiménez *et al.*, 2012) and of the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata* (Behar *et al.*, 2008a). In herbivorous ants, bacterial nitrogen fixation is an important source of nitrogen for amino acid synthesis and allows these insects to live on plant-based diets (Eilms and Heil, 2009). Thus, it is plausible that an enterobacterial diazotrophic community that fixes nitrogen in adults during the reproductive (autumn) and diapause (winter) periods to ensure amino acid synthesis may be required to permit *T. lusitanicus* to feed on acorns (Verdú *et al.*, 2007).

It has also been suggested that these Enterobacteriales could be involved in the detoxification of defensive coniferous compounds (e.g., monoterpenes, diterpene acids and phenolic resins) in *Dendroctonus frontalis* (Vasanthakumar *et al.*, 2006). Therefore, it is conceivable that in *T. lusitanicus* these bacteria could also have an important role in the detoxification of defensive acorn substances, which primarily consist of phenolic compounds (Cantos *et al.*, 2003). Alternatively, it has been reported that the Mediterranean fruit fly *C. capitata* inoculates Enterobacteriales into fruit, causing fruit decay and accelerating seed maturation (Behar *et al.*, 2008b). Similarly, *T. lusitanicus* could inoculate enterobacteria into acorns, triggering germination and contributing to oak seedling recruitment (Pérez-Ramos *et al.*, 2007). Other bacteria isolated from *T. lusitanicus* that could potentially be involved in the nitrogen cycle are several Betaproteobacteria genera belonging to the order Burkholderiales including *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Cupriavidus*, and *Comamonas*, which are known to be actively involved in denitrification processes (Ishii *et al.*, 2009). Lastly and importantly, bacteria belonging to Enterobacteriales found in the guts of some Scarabaeoidea larvae have also been recently associated with cellulolytic activity (Huang *et al.*, 2012; Mabhegedhe, 2012); therefore, we should not discard the possibility that their presence in *T. lusitanicus* may serve to assimilate plant compounds.

The dung beetle *T. lusitanicus* carries in the gut several species belonging to the phylum Actinobacteria. These bacteria are able to produce a great variety of secondary metabolites with antibiotic properties and are mainly considered to be defensive symbionts in insects (Kaltenpoth, 2009; Seipke *et al.*, 2012). Moreover, experimental studies in the desert locust (Dillon *et al.*, 2005) showed that a diverse gut microbiota is able to provide better resistance against invasion by pathogenic bacteria. In this regard, individuals of *T. lusitanicus* that feed on acorns and harbor a more diverse gut flora would be able to survive longer and remain healthier than individuals eating dung (JRV and JML, personal observations).

In *T. lusitanicus*, we found various *Firmicutes* genera including *Bacillus* and *Lactobacillus/Enterococcus* (lactic acid bacteria). It has been reported that lactic acid bacteria could represent up to 1.8% of the total human gut microbiome (Pessione, 2012), and *Enterococcus* is particularly abundant in the gut of the polyphagous moth *Helicoverpa* (Gayatri Priya *et al.*, 2012). Lactic acid bacteria are predominantly saccharolytic (they enhance energy recovery by degrading otherwise indigestible sugars), generate an acid environment, and protect against gas-producing putrefactive and sulphate-reducing bacteria (Pessione, 2012). A cellulose-rich diet increases the presence of this type of bacteria, whereas a protein/fat-rich diet favors the growth of *Clostridium* (Pessione, 2012). Therefore, the presence of *Firmicutes* (and the relative richness of the genera of this phylum) in *T. lusitanicus* might be directly related to and dependent on the polyphagous behavior of this beetle. However, it is important to note that interpretation of our results regarding *Firmicutes* is only tentative and highly dependent on future determination of the relative abundance of the anaerobic genus *Clostridium*, which dominates the gut microbiota of e.g., humans and mice (Turnbaugh *et al.*, 2006; Ley *et al.*, 2005).

In summary, we report the first insight into the composition and richness of a fraction (culturable, aerobic, facultative anaerobic, and aerotolerant) of the microbiota living in the gut of *T. lusitanicus*, an atypical dung beetle with a polyphagous diet. The diversity of the isolated culturable bacteria fraction is of the same level found in other coleopterans and likely provides the required wide functional (saccharolytic, nitrogen-

fixing, detoxifying, etc.) capacities associated to polyphagy. This bacterial enrichment could favor the consumption and assimilation of a wider variety of vegetable, animal and fungal tissues. Comparative data on variations in the gut microbiota of individuals subjected to different diets and other control experiments are in progress (and will be published elsewhere) to establish the role played by the gut bacterial community of this species in the physiological and developmental improvements observed with the consumption of acorns.

The design of the present study allowed us to identify culturable aerobic, facultative anaerobic, and aerotolerant bacteria, which represent only a relatively small fraction (that capable of exploiting a protein rich diet) of the total flora of the gut in *T. lusitanicus*. There are several ways in which the present exploratory study could be continued. Isolation media strongly influence the types of bacteria that can be coaxed out of microbial assemblages into culture. Therefore, it is anticipated that additional media types (e.g. 10% tryptic soy agar, M9+cellulose+casamino acids), and especially those mimicking the nutritional profile of the beetle gut (e.g. cattle or red tail deer dung extract solidified with agar or gellan gum) will improve the likelihood of isolating a wider variety of gut residents. In particular, future studies should determine the culturable fraction of strict anaerobic representatives of the beetle gut microflora. In addition, by quantifying colony-forming units of each cultured species, it would be also possible to obtain percentages of relative abundance. This will allow full identification of gut microbiome and accurate quantification of the community members. Moreover, potential functions of the different isolated bacteria, as described here, could be experimentally confirmed through specific functional analyses of the isolates. Furthermore, future studies using genomic tools should also be able to unravel the significant richness, both aerobic and anaerobic, that is present in the gut of this insect. These studies could be further refined by distinguishing between midgut and hindgut. Moreover, transcriptomic approaches comparing the expression of the gut microbiomes of individuals feeding on acorns or dung diets should also contribute to a better understanding of the evolutionary and ecological changes induced by adaptation to a different dietary selection in the context of the fitness of this dung beetle species.

Acknowledgements

This study was supported by the project 065/2002 of the Ministry of Environment, and the projects “Thorbellota” (CGL2008/03878/BOS) and “NiTerDist” (CGL2011-515 25544) of the Secretaría de Estado de Investigación, Desarrollo e Innovación. We thank Tania Gaitero and Irene Galán of the Animal Health Department in the Veterinary School for cooperating in this project. Dr. Rafael Zardoya from the National Museum of Natural Sciences is gratefully acknowledged for reading a previous version of the paper and providing insightful comments. N.H., J.A.E. and A.S.M. were pre-doctoral fellows of the INIA-MCI, Complutense University and Ministry of Education and Science, respectively. Authors of this paper have not conflict of interest to declare.

Figure 1. Reconstructed phylogram tree under maximum likelihood based on 16S rRNA sequences (see text) of culturable aerobic, facultative anaerobic and aerotolerant bacteria living in the gut of the dung beetle *Thorectes lusitanicus*. Labels at the tips indicate Genbank accession number. Branches in red correspond to isolated from the dung beetle (PM). Numbers in the nodes are bootstrap supports.

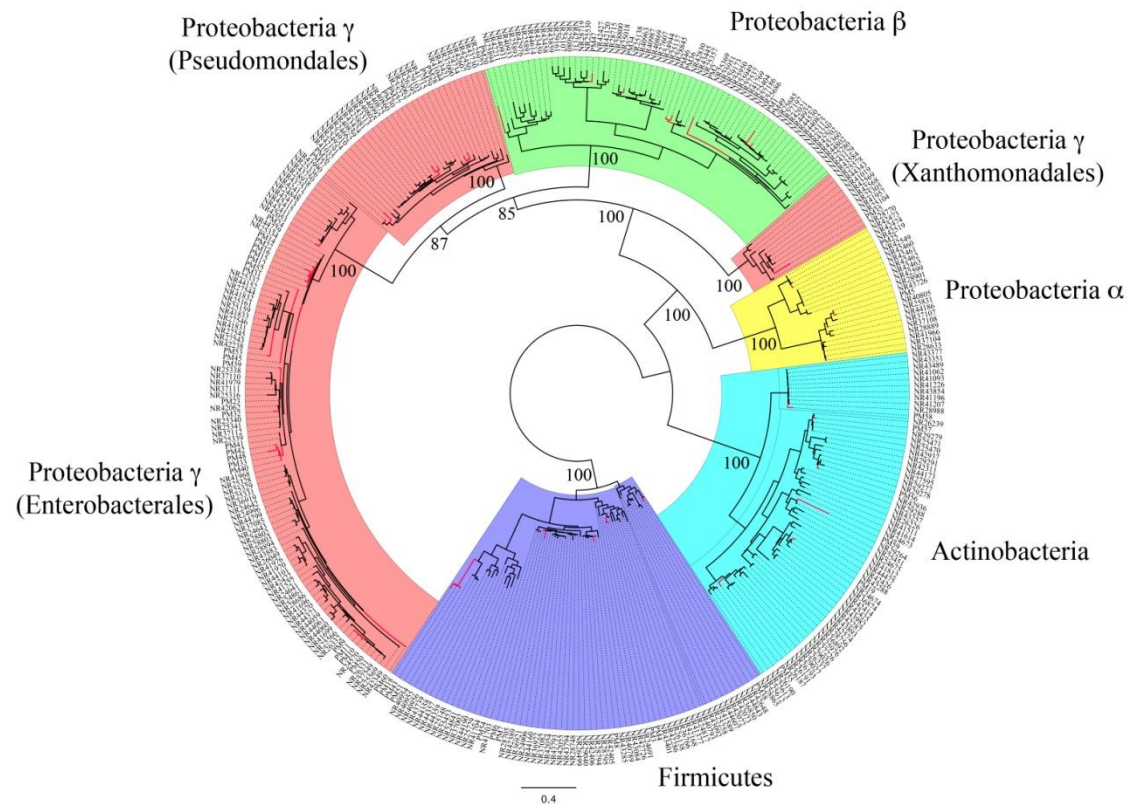


Table 1. Culturable aerobic, facultative anaerobic and aerotolerant bacteria from the hindgut of *T. lusitanicus*.

Isolate	Lenght (bp)	Best BLAST hit	%	Phylum	Order
PM1	584	<i>Achromobacter spanius</i>	98	Beta proteobacteria	Burkholderiales
PM2	987	<i>Pusillimonas noertmannii</i>	96	Beta proteobacteria	Burkholderiales
PM3	997	<i>Bacillus megaterium</i>	99	Firmicutes	Bacillales
PM4	1012	<i>Bacillus megaterium</i>	99	Firmicutes	Bacillales
PM5	963	<i>Brevundimonas terrae</i>	99	Alphaproteobacteria	Caulobacteriales
PM6	847	<i>Enterococcus devriesei</i>	99	Firmicutes	Lactobacillales
PM7	938	<i>Enterococcus durans</i>	99	Firmicutes	Lactobacillales
PM8	1021	<i>Enterococcus silesiacus</i>	99	Firmicutes	Lactobacillales
PM9	501	<i>Escherichia fergusonii</i>	99	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales
PM10	1021	<i>Shigella flexneri</i>	99	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales
PM11	1000	<i>Shigella flexneri</i>	99	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales
PM12	937	<i>Obesumbacterium proteus</i>	99	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales
PM13	830	<i>Lactococcus garviae</i>	99	Firmicutes	Lactobacillales
PM14	1026	<i>Obesumbacterium proteus</i>	99	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales
PM15	993	<i>Obesumbacterium proteus</i>	99	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales
PM16	988	<i>Obesumbacterium proteus</i>	99	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales
PM17	956	<i>Lactococcus garviae</i>	99	Firmicutes	Lactobacillales
PM18	1006	<i>Lactococcus lactis</i>	93	Firmicutes	Lactobacillales
PM19	905	<i>Leucobacter albus</i>	99	Actinobacteria	Actinomycetales
PM20	1041	<i>Vitreoscilla estercoaria</i>	92	Beta proteobacteria	Neisseriales
PM21	811	<i>Pectobacterium carotovorum</i>	98	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales
PM22	1016	<i>Obesumbacterium proteus</i>	99	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales
PM23	941	<i>Serratia liquefaciens</i>	99	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales
PM24	1022	<i>Providencia rettgeri</i>	99	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales
PM25	910	<i>Pseudochrobactrum assacharolyticum</i>	99	Alphaproteobacteria	Rhizobiales
PM26	1011	<i>Pseudomonas tuomuerensis</i>	97	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales
PM27	1467	<i>Pseudomonas oryziatibant</i>	98	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales
PM28	1000	<i>Pseudomonas xanthamarina</i>	98	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales
PM29	951	<i>Pseudomonas psudoalcaligenes</i>	97	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales
PM30	1045	<i>Pseudomonas graminis</i>	98	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales
PM31	939	<i>Serratia grimesii</i>	99	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales
PM32	1024	<i>Serratia liquefaciens</i>	94	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales
PM33	873	<i>Serratia fonticola</i>	99	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales
PM34	1475	<i>Cupriavidus talwanensis</i>	98	Beta proteobacteria	Burkholderiales
PM35	609	<i>Stenotrophomonas acidominiphila</i>	98	Gammaproteobacteria	Xanthomonadales
PM36	598	<i>Alcaligenes faecalis</i>	99	Beta proteobacteria	Burkholderiales
PM37	1500	<i>Pseudomonas tuomuerensis</i>	99	Gammaproteobacteria	Pseudomonadales
PM38	977	<i>Solibacillus silvestris</i>	99	Firmicutes	Bacillales
PM39	1463	<i>Serratia proteomaculans</i>	99	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales
PM40	1013	<i>Serratia fonticola</i>	99	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales
PM41	976	<i>Serratia fonticola</i>	99	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales
PM42	857	<i>Serratia fonticola</i>	99	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales
PM43	987	<i>Lactococcus lactis</i>	93	Firmicutes	Lactobacillales
PM44	903	<i>Arthrobacter protophormiae</i>	96	Actinobacteria	Actinomycetales
PM45	1024	<i>Serratia grimesii</i>	98	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales
PM46	1465	<i>Alcaligenes faecalis</i>	98	Beta proteobacteria	Burkholderiales
PM47	1002	<i>Comamonas aquatica</i>	97	Beta proteobacteria	Burkholderiales
PM48	236	<i>Serratia fonticola</i>	99	Gammaproteobacteria	Enterobacillales
PM49	782	<i>Achromobacter denitrificans</i>	99	Gammaproteobacteria	Burkholderiales
PM50	1489	<i>Shigella flexneri</i>	99	Gammaproteobacteria	Enterobacillales
PM51	802	<i>Lactococcus lactis</i>	91	Firmicutes	Lactobacillales
PM52	1013	<i>Obesumbacterium proteus</i>	99	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales
PM53	985	<i>Yersinia rohdei</i>	99	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales
PM54	930	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	99	Firmicutes	Lactobacillales
PM55	908	<i>Arthrobacter gangotriensis</i>	96	Actinobacteria	Actinomycetales
PM56	930	<i>Sanguibacter inulinus</i>	99	Actinobacteria	Actinomycetales
PM57	922	<i>Oerskovia enterophila</i>	99	Actinobacteria	Actinomycetales
PM58	917	<i>Streptomyces microflavus</i>	96	Actinobacteria	Actinomycetales
PM59	326	<i>Pseudoclavibacter helvolus</i>	93	Actinobacteria	Actinomycetales
PM60	918	<i>Enterobacter amnigenus</i>	94	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales
PM61	967	<i>Escherichia coli</i> O26:H11	99	Gammaproteobacteria	Enterobacteriales

CAPÍTULO II

Effect of the diet on the diversity of the intestinal microbiota of the polyphagic dung beetle *Thorectes lusitanicus*

Noemi Hernández, Amparo Latorre, Xavier Triadó, Jorge M. Lobo, José R. Verdú, Emilio O. Casamayor, Andrés Moya, Mónica Suárez

Artículo en preparación para *PLoS ONE*

Resumen

Los cambios en la dieta en *Thorectes lusitanicus* dan lugar a una serie de cambios en el animal y de ventajas adaptativas. Tanto a nivel macroscópico, ya que aumenta las proteínas anticongelantes de la linfa que le permiten vivir en medios con temperaturas extremas, como a nivel microscópico con el aumento del tamaño de algunos de los órganos, como son el cuerpo graso y los ovarios, lo que da lugar a que tengan más reservas energéticas y mayor éxito reproductivo. Estos cambios se ven, además, reflejados en la microbiota intestinal.

Para determinar la variación de la microbiota intestinal con la dieta se analizaron dos poblaciones de escarabajos cuya variable fue la dieta (bellotas o heces). Las muestras analizadas fueron secuenciadas por el método de Sanger y por secuenciación masiva 454 o pirosecuenciación (Roche). Se analizaron un total de 374 fragmentos de ADN correspondientes al gen *16S rARN* y se concluyó que en su mayoría las bacterias de la microbiota intestinal de *T. lusitanicus* pertenecían al filo de las Proteobacteria (66.3%), siendo mayoritaria la familia *Enterobacteriaceae* y correspondiendo el resto de este filo a otras bacterias ambientales. En el intestino de los escarabajos alimentados con bellotas se encontraron de modo exclusivo bacterias pertenecientes a 6 géneros concretos: *Kocuria*, *Catellatospora*, *Hamadaea*, *Micromonospora*, *Mycobacterium* y *Nakamurellaceae*. En el intestino de los escarabajos alimentados con heces fueron encontrados los siguientes 6 géneros de modo específico: *Demequina*, *Cellulomonas*, *Gordonia*, *Agrococcus*, *Arthrobacter*, y *Clavibacter*. Además, se encontraron géneros compartidos por ambas poblaciones independientemente del tipo de dieta y que, probablemente, forman la microbiota de base o *core*. Los 8 géneros comunes en ambas poblaciones fueron: *Marmoricola*, *Bacilli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Hafnia*, *Kluyvera*, *Raoultella* y *Serratia*. Por ello, acorde a resultados obtenidos se corrobora la hipótesis de que la dieta da lugar a un cambio cualitativo sustancial en la microbiota intestinal de *T. lusitanicus*. Algunos de esos géneros, en simbiosis con el escarabajo, están probablemente implicados en la degradación de los diferentes componentes de la dieta y en la síntesis de algunas macromoléculas esenciales. En el caso de los escarabajos cuya dieta son heces poseen una carencia de nutrientes, en

especial aminoácidos, que probablemente deben ser provistos por las bacterias de la microbiota.

Abstract

The dynamic bacterial community in the gut of arthropods has a great relevance for their ecology. Here, we describe the gut bacterial diversity inhabiting two populations of the dung beetle, *Thorectes lusitanicus* having two different diets. Variations in the diet produce important structural and physiological changes in these beetles, including changes in the amount of fatty acids and anti-freeze molecules inside the lymph, as well as in the size of some organs. Thus, we analyzed using molecular techniques the gut microbiota of a polyphagic dung beetle that can eat both faeces and acorns. The beetles were divided into two groups where one group was exclusively fed on acorns and the other on faeces for a period of one month.

We performed fingerprinting and metagenomic studies in order to analyse the bacterial diversity conforming intestinal microbiota of *T. lusitanicus*. DNA samples from each population were extracted using standard procedures, and the *16S rRNA* gene was amplified and sequenced by the Sanger and 454 sequencing technologies. A total of 371 different sequences were obtained. The main finding in this study is that most of the detected bacteria were related to the family Enterobacteriaceae and to environmental bacteria. Eight bacterial genera (*Marmoricola*, *Bacilli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Hafnia*, *Kluyvera*, *Raoultella*, *Serratia*) were common between the two different populations. In the gut of beetles feeding on acorns, bacteria belonging to *Kocuria*, *Catellatospora*, *Hamadaea*, *Micromonospora*, *Mycobacterium*, and *Nakamurellaceae* were detected. In contrast, in the gut of beetles feeding on faeces, the genera *Demequina*, *Cellulomonas*, *Gordonia*, *Agrococcus*, *Arthrobacter*, and *Clavibacter* were detected. Some of these genera could be involved in the degradation of the different compounds in the diet and in the synthesis of essential compounds. Overall, our results suggest that the gut bacterial community in these insects is strongly affected by diet.

Introduction

The animal gut harbours a micro ecosystem made up of diverse bacteria. This microbiota and its genomic content (microbiome) provide organisms with the adequate metabolic characteristics to use nutrients which themselves cannot metabolise (Zoetendal *et al.*, 2008). Backhoes *et al.* (2005) showed how the microbiota in the bowels of human beings has co-evolved with them in order to generate a mutualism that is profitable for both of them. The gut microbiota usually has spatiotemporal variation, and in the case of insects also has a variation among different developmental stages (Kurokawa *et al.*, 2007). In insects, a relatively high diversity of microbial populations has been described in the lumen of the gut of several groups: termites, blood-feeding heteropteran bugs, pyrrhocorid bugs, anopluran, ants, flower-scarab beetles, longhorn beetles (Breznak, 1982; Douglas and Beard, 1996). The microbiota inhabiting in the midgut and hindgut of insects has several roles in metabolising nutrients, digestion, and reproduction (Douglas and Beard, 1996; Mittler, 1986; Campbell, 1989; Cazemier *et al.*, 1997; Egert *et al.*, 2003) as well as, in some cases, in the transmission of pathogens from and to other animal species (Beard *et al.*, 1992).

Dung beetles play an important role in several ecological processes, including organic matter recycling and in the soil structure (Brussard and Hijdra, 1986; Mittal, 1993). They also have a role as secondary seed dispersers since they bury seed-containing faeces in the soil (Andresen, 2002; Shepherd and Chapman, 1998; Vander Wall and Longland, 2004; Vulinec, 2000). Recently, a novel interaction has been described between *Thorectes lusitanicus* (Coleoptera, Scarabeoidea, and Geotrupidae) and two oak species (*Quercus suber* and *Quercus canariensis*) from the South Eastern Iberian Peninsula. This interaction could be crucial for ensuring seedling recruitment and sustaining the equilibrium of oak populations (Pérez-Ramos IM *et al.*, 2007). For *T. lusitanicus*, an acorn based diet was found to improve resistance to low-temperature conditions and ovarian development (Verdú *et al.*, 2009). Moreover, field observations showed a polyphagous behaviour of this species that are able to feed on dung, acorns, fresh fungi, carrion, and plant leaves in contrast to the strict coprophagous behaviour

of many dung beetles (Halffter and Matthews, 1966). It is therefore interesting to know how *T. lusitanicus* choose its ecological niche and to characterize the emerging relationship with the gut microbiota involved in the assimilation of this great variety of food resources. Acorns and faeces harbour very different and specific microorganisms, especially taking into account that the microbial load of faeces depends largely on the mammal it originates from. As a result, the diversity of the microorganisms colonizing the intestines of these beetles should be very different.

Studies about the diversity of microbial species living in the gastrointestinal tract is tightly connected to the advent of new molecular techniques that aid at identifying species based on their *16S rRNA* sequence (Wang *et al.*, 2005). These techniques include fingerprinting of *16S rRNA* amplicons, sequencing of the *16S rRNA* clones, fluorescent in-situ hybridization, DNA microarrays, and high-throughput sequencing. Data collected from these experiments has shown that bacteria and other microorganisms living in the gut have a variation in composition based on inner conditions (such as the age and genotype of the host) and phenotypic conditions (such as the diet and the climate).

Specific molecular techniques that are commonly used in these experiments include the DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis). DGGE is a fingerprinting technique that separates DNA fragments according to their mobilities under increasingly denaturing conditions (increasing formamide/urea concentrations) and offers the best compromise between the number of samples processed and the information obtained (Muyzer *et al.*, 1998). Another technique is clone library sequencing using the Sanger method. This method was used in order to generate data in most microbial genome and metagenomics sequencing projects. In addition, the 454 pyrosequencing (Roche) of the *16S rRNA* of intestinal bacteria has greatly improved our understanding of the intestinal microbiota. This technique provides longer read lengths and faster data processing as compared to the Sanger method (Andersson *et al.*, 2008; Booiijink *et al.*, 2010).

In this study, we identified the diverse microorganisms making up the microbiota of the dung beetle *T. lusitanicus* under different diets in an aim to better understand the role of the microbiota in the guts of this organism.

Material and Methods

Ethics statement

This work conforms to the Spanish legal requirements including those in relation with conservation and welfare. Permission for the collection of beetles and for field studies in the Los Alcornocales Natural Park (Cadiz, Spain) were obtained from L.M. Navarro-Gallegos (Veterinary) and M. Malla-Alcaraz (Technical Office Responsible of the Natural Park). This work is part of the project CGL2008-03878/BOS that has authorization under Article 9 of Law 8/2003, of 28 October, “Flora and Fauna”, on exceptions to the general protection of Address General Management of the Environment (Ministry of Environment, Government of Andalusia).

Sample collection

T. lusitanicus beetles were captured in “Los Alcornocales” Natural Park in southern Spain in autumn (November 2010 and 2012). For *T. lusitanicus*, this period coincides with the ingestion of acorns, fungi, madrone fruits and dung (mainly from cattle and red deer).

The beetles that were studied were divided into 2 groups based on their diet. One group was fed on acorns while the other group was fed on faeces. Different molecular techniques were used in the identification of the flora inhabiting the guts of the samples from both populations in order to avoid methodological biases (Daniel, 2005). A total of sixteen (2010) and six (2012) *T. lusitanicus* specimens were randomly collected and maintained in plastic containers at 20°C with humidity until their arrival at the laboratory. There, individuals were maintained at 10°C in a climate chamber (with a temperature that is similar to the average temperatures experienced in the

field during autumn) in order to eliminate stress. The specimens were randomly divided into two populations where one population was fed on acorns of *Q. ilex* (named A) and the other was fed of faeces of cow (named F). This ensured that the transient intestinal microbiota would depend directly on the diet. Numbers were used to differentiate the specimens within each community.

Whole bowel dissection of beetles was conducted in sterile conditions. The obtained specimens were immediately stored in special containers and preserved in liquid nitrogen. The frozen bowels were broken and homogenized at -80 ° C in order to successfully extract nucleic acids. DNA extraction was then performed using the Power Soil DNA Isolation kit (Mo Bio, Canada). Humic acids that could hinder subsequent steps were avoided using this kit (special for soil samples).

PCR amplification of bacterial 16S rRNA gene sequences

A 550-bp fragment suitable for the DGGE analysis was obtained using two primers: 358F (5'-AGACTCCTACGGGAGGCAGCAGT-3') with a GC clamp and 907R (5'-CCGTCAATTCCTTTRAGTTT-3').

The reaction conditions consisted of a total of 35 cycles that began with the denaturation of DNA at 94° C for 4 minutes, followed by 10 cycles at 94° C (one minute), 65 ° C (one minute with a gradient of 1° C drop), and 72° C (three minutes) each, and 17 cycles at 94° C (one minute), 55° C (one minute), and 72° C (three minutes) each. The PCR ended with an extension phase at 72° C for 5 minutes.

Denaturing Gradient Gel Eletrophoresis (DGGE)

DGGE for bacteria was run for 3.5 h at a constant voltage of 200 V and a temperature of 60° C in a 20 to 80% vertical denaturant gradient (100% denaturant agent with 7M urea and 40% deionized formamide). Gels were stained and photographed with UV transillumination in a Gel Doc system.

Clone Library

The extracted DNA was amplified by PCR using the specific primers M13F (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3') and M13R (5'-TTCACACAGGAAACAG-3'). The conditions of the polymerization reaction were: denaturation of DNA at 94° C for 1 minute, then 30 cycles at 94° C (1 minute), 51° C (1 minute), and 72° C (2 minutes) each. This was followed by an elongation phase for 5 minutes at 72° C. A polyA tail in one cycle of 72° C for 10 minutes was also added. Subsequently, the PCR products were cloned using the TOPO TA Cloning® kit (Invitrogen). The positive colonies were transferred to a 96-well plate containing Luria Broth and 7% glycerol. They were then stored at -20° C until sequenced in MacroGen Europe. For the sequencing of the 16S *rRNA* gene, the 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') and 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') 16S universal primers were used.

PCR product purification and pyrosequencing

PCR amplification of DNA samples from each specimen was done using the primers listed in Table 1. These primers are universal and are designated for amplifying the intronic sequence V3 that is within the 16S *rRNA* gene, which has about 450 bp. They were tagged to help in the identification of each of the PCR products. The PCR conditions were 2 minutes of initial denaturation at 95° C followed by 30 cycles of denaturation (30 seconds at 95° C), annealing (30 seconds at 54° C), and elongation (30 seconds at 72° C), each, followed by a final elongation period (8 minutes at 72° C). Each reaction was purified by filtration. After amplification, the same amount of DNA (measured using a Nanodrop) from different samples was pooled into one eppendorf tube. The pooled DNA was then sent to C.S.I.S.P. (Centro Superior de Investigaciones en Salud Pública, Valencia) for 454-pyrosequencing on a Genome Sequencer FLX system (Roche).

Sequence analysis

Sequences were analysed using the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) that is available at NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) in order to determine the closest relatives in the database. The new sequences were added to an alignment full of prokaryotic 16S *rRNA* sequences by using the automated aligning tool of the ARB program package (Technical University of Munich, Munich, Germany [<http://www.arb-home.de>]). Analysis of sequence similarity was then done by constructing a similarity matrix using the ARB facilities.

Sequences with low average quality scores (<20) and short read lengths (<200 nt) were removed from the analysis. The remaining sequences were checked using the *chimeras.slayer* and the *chimera.pintail* tools as implemented in the mother software package v.1.13.0.

Taxonomic affiliation

The taxonomic affiliation of partial-length sequences was determined using the Classifier tool of the Ribosomal Database Project-II (RDP) (Cole, *et al.*, 2005; Cole, *et al.*, 2007; Cole *et al.*, 2009). This method provides rapid taxonomic classification ranging from domain to genus of both partial and full-length 16S *rRNA* gene sequences. A 50% bootstrap threshold was used. The number of reads so as to have an average quality of reads was done using the pipeline initial and RDP classifier (both from RDP tools). Each sample was trimmed in such manner as to remove non-quality sequences.

Phylotype definition

The number of reads in each sample was adjusted to the smallest data set size. The quality of the obtained reads was adjusted in the same manner as described in the previous section.

Estimation of bacterial diversity

The Shannon Diversity index (H) (Shannon, 1948) that correlates positively with taxa richness and evenness, the Chao1 richness estimator (Chao, 1984; Chao *et al.*, 2000), and rarefaction curves, were calculated for each sample at the family, genus and order levels (clusters at 98% sequence identity).

Statistical comparison of sample composition

The variation patterns in the taxonomic distributions found among our samples was investigated using Detrended Correspondence Analysis (DCA). Diversity and richness indices and DCAs were calculated using the free-licence R package and the vegan R package.

Results and discussion

DGGE was used as a survey tool that has the ability to detect the changes in the content of dominant populations, the reproducibility of the profiles generated, and to provide the opportunity to excise bands of interest that identify specific operational units (OTUs) (Drees *et al.*, 2006; Hold *et al.*, 2002; Legatzki *et al.*, 2011; Maier *et al.*, 2010). Figure 1 shows the DGGE gel obtained. A binary matrix was also performed in order to confirm the data of fingerprints. Upon comparing the samples, certain bands associated with specific microorganisms were observed in all the all profiles independently of the diet whereas others were restricted to beetles fed on a certain diet. This finding confirms a previous study from our laboratory, which showed that certain species detected by their unique *16S rRNA* sequences were associated with the type of diet (Hernández *et al.*, 2013)

The diversity of microorganisms detected by DGGE among beetles fed on a faeces diet was higher than that detected among beetles fed on an acorns diet. This could reflect the fact that faeces offer a more complex matrix of compounds as compared to acorns. Nevertheless, by using this method, several artefacts that could result in showing multiple bands for single isolates (Neilson *et al.*, 2013), multiple

sequences associated with a single band position, and heteroduplex bands (Satokari *et al.*, 2001) are documented and cannot be discarded. Therefore, caution for avoiding such errors was taken during analysis and other techniques were implemented in order to overcome the limitations of this one.

To gain further insights on the bacterial diversity, the DNA was cloned and 16S *rRNA* sequences were analyzed. A total of 374 species of bacteria were detected in the gut of the dung beetle *T. lusitanicus*, and associated with different phyla (Table II). The major phylum detected was Proteobacteria with a percentage of 66.31%. Firmicutes were present in 17.11% of the samples whereas Bacteroidetes and Actinobacteria were encountered in 9.62% and 4.28% of the samples, respectively (Fig. 2). These findings are in agreement with other reports showing that Enterobacteriaceae (which belong to the Proteobacteria) are the most common encountered bacteria in the gut and that Firmicutes have the capacity to survive in extreme environmental conditions (such as those found in the gut) (Garrity *et al.*, 2003). The bacterial diversity detected among beetles fed on a faeces diet was higher than that detected among beetles fed on an acorns diet when sequencing was used (Table III). However, this higher diversity was lower than the expected from comparing the complexity of compounds present in faeces to that present in acorns (Rodríguez-Estévez *et al.*, 2008). Moreover, it was also expected to find a higher amount of environmental bacteria involved in the metabolism of fatty acids among beetles fed on an acorns diet since fatty acids are a major constituent of acorns. At least, bacteria belonging to the genus *Arthrobacter* which are responsible of metabolising aromatic acids were detected (Chen and Mulchandani, 1998). Another reason to expect having more fatty acid metabolising bacteria in beetles fed on an acorns diet is that they have a large fatty body due to the accumulation of fatty acids that could serve as an energy reservoir for beetles and bacteria alike (Verdú *et al.*, 2009).

The existence of these bacteria in the beetle gut gives a number of advantages that go beyond the ability of the host to provide a niche and protection against colonization of other bacteria that could compete with the available populations for resources. The mutualistic symbioses between bacteria and eukaryotic hosts allow animals to feed on a wider diversity of diets that would otherwise be inaccessible to

the host. For example, the degradation of some secondary metabolites and vitamins is not possible for humans without the help provided by symbiotic bacteria. Studies on *T. lusitanicus* were initiated by Verdú *et al.* (2009), who showed a relationship between the microbiota and a change in habits, composition of the hemolymph, fat body size, and ovary size.

Studying the diversity by means of sequencing the *16S rRNA* is a method that is universal. However, studies investigating the robustness of this method indicate that it is better to reconstruct phylogenetic trees using more than one gene. Therefore, the use of the 454-pyrosequencing protocol could be a rapid and efficient alternative for identifying the different taxonomic levels (Hong P-Y *et al.*, 2011). We used this method to classify bacteria based on the similarity of sequences using BLAST, and restricting the analysis to higher taxonomic levels such as order, family, and genus.

The diversity and richness of microorganisms in the two sets was assessed using the Chao1 and Shannon H indices. Beetles fed on a faeces diet had a richer microbiota as compared to those fed on acorns. In contrast, diversity was higher in the group fed on acorns compared to that fed on faeces. This is an unexpected finding since presumably diversity should have been higher in the group being fed on faeces. Moreover, comparison of all the beetles using the Chao1 (Table IV) and Shannon index H (Table V) indices showed that there is a lack of homogeneity of microorganisms among our samples. The highest heterogeneity was detected in the dung beetle F_3.

The relative abundance of the samples was studied at the order, family and genus levels using heatmaps of barplots (Figure 3). The barplots for the order and family levels were very similar with only slight differences. However, the analysis at the genus level showed that some bacteria belonging to particular genera had an abundance greater than 1%, corresponding to a total of 334 phylotypes (Figure 4). Some of the phylotypes did not correlate to any specific diet, supporting the hypothesis that the beetles have a core microbiota independent of the diet. Barplots showed some homogeneity among beetles feeding on acorns, as was detected also with the DGGE and the clone library.

Our data shows that 8 genera (*Marmoricola*, *Bacilli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Hafnia*, *Kluyvera*, *Raoultella*, *Serratia*) are shared among all beetles with a predominance of the genus *Raoultella* (43.75%). However, it is important to note that *Raoultella* had a minor presence in F_2 and A_1 (in each specimen close to 0,15%) (Tables V and VI, Supplementary Data). As mentioned above, these genera form a group of microorganisms that are commonly found in the intestinal flora of the dung beetles regardless of diet. Similarly, in the human Microbiome, some bacteria were found to be common while others differed based on factors such as health, illness, and age (Turnbaugh *et al.*, 2009; Sorek and Cossart, 2009).

Also, there were some genera that could be correlated with a specific type of diet. In the case of beetles fed with acorns, the following genera were exclusive: *Kocuria*, *Catellatospora*, *Hamadaea*, *Micromonospora*, *Mycobacterium*, *Nakamurellaceae*, *Streptacidiphilus*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodoplanes*, *Sinorhizobium*, *Ensifer*, *Anaplasma*, *Anaplasma*, *Schlegelella*, *Herbaspirillum*, *Silvimonas*, and *Nitrosospora*. Among the beetles fed with faeces we identified the following exclusive genera: *Demequina*, *Cellulomonas*, *Gordonia*, *Agrococcus*, *Arthrobacter*, *Clavibacter*, *Fronidhabitans*, *Leifsonia*, *Phycicola*, *Salinibacterium*, *Schumannella*, *Yonhghaparkia*, *Pseudosporangium*, *Aeromicrobium*, *Rhodococcus*, *Segniliparus*, *Prevotella*, *Rikenella*, *Dyadobacter*, *Emticicia*, *Leadbetterella*, *Fluviicola*, *Filimonas*, and *Sediminibzcterium*. *Prevotellaceae* are known to be involved in the biosynthesis of secondary metabolites, transport, and catabolism. Actually, they were commonly identified with bacteria belonging to Ruminococcaceae, where complementary roles may have been in effect. These findings highlight the importance of the microbiota of the gut in the defence against pathogens and the general maintenance of good health.

The phylum encountered in higher proportion in this study was Proteobacteria with a total of 128 phylotypes. However, in related studies on arthropods, the majority of phyla were Firmicutes (Martínez-Falcón *et al.*, 2011). The presence of lactic acid metabolising bacteria (Firmicutes) is thought to aid in the degradation of sugars during the larval stage. Hence, the prevalence of Proteobacteria in our samples may be due to all being from adult beetles. A total 42 of the identified phylotypes were associated

with a particular diet, but the majority were encountered in the populations fed either diet. In fact, most recent studies addressing the microbiota of the dung beetle *Onthophagus taurus*, also found Proteobacteria, as the most common phylum.

We had evidence of other phyla, classes and orders within the gut microbiota of *T. lusitanicus* that were already found in previous studies based on direct bacterial isolation (Hernández *et al.*, 2013) and could have an important role in the survival of coleopteran. For instance, the phylum Actinobacteria (*Marmoricola* and some bacteria that have not been classified into a specific genus but were found to be within the Actinomycetales) and the class Gammaproteobacteria (*Enterobacter*, *Hafnia*, *Kluyvera*, *Raoultella* and *Serratia*) were found to be common between both groups of beetles with different diet. Martínez-Falcón *et al.* (2011) demonstrated that all insects that feed on decaying cactus in their larval stages harboured a common set of bacteria belonging to the same genus. These bacteria share a common role and play a part in the degradation of nitrogen. Moreover, several studies have shown that some bacteria that were commonly isolated from beetles could be acquired by vertical transmission from the mother. In the case of the fruit fly, Ben-Yoseph *et al.* (2008), also found that the microbiota colonizes plant surfaces before hatching. Therefore, part of the microbiota that colonized the gut was already present in the diet. Most of the previous studies on the general patterns of microbiota were focused on mammalian hosts. Here, we were able to show that the same concepts apply to beetles as well. Roeselers (2011) indicated that members of the same species tend to have gut bacterial communities of similar taxonomic compositions at the phylum or class level, regardless of the domestication status of beetles. The group also showed some shallow phylogenetic differences emerging between wild and domestic. Comparing studies about diversity and the specificity of niche, Tamames (2010) in a comprehensive study spanning across 211 prokaryotic species, it was found that only 3 species were specific to the mammalian gastrointestinal tract. These species belonged to the *Clostridia* and the *Succinivibroinacidae* families. The reason given for the presence of these organisms is the fact that they are strict anaerobes that could only find an appropriate niche in the intestines of mammals (and especially ruminants). They also reported the presence of *Proteobacteria* such as *Xanthomonadaceae*, *Comamonadaceae*,

Pseudomonadaceae, and Burkholderiaceae. In our study, the phyla encountered were very diverse and hundreds of phylotypes could be identified from each sample (Table VI and Supplementary Data). The microbiota among the beetles being fed faeces was found to be more complex

In this study one source of bias could come from the vegetable substrates where the beetles live. It can influence the presence of microorganisms that are able to degrade them and therefore change their micro-environment. In our study, the beetles were fed with specific diets that were collected in a nonsterile substrate manner in order to mimic the natural environment. As a result, some fungi and yeast may have been present in the food that could have had an effect on the composition of the microbiota through the production of metabolites that could be toxic to one or more microorganisms (Kinoshita *et al.*, 2000).

Rarefaction curve analysis was used in order to ascertain whether all the orders, families, or genera in the samples had been recovered (Figure 5). This method had been previously used to detect the rate at which new families emerge among samples in sequencing studies (Gosalbes *et al.*, 2010; Gosalbes *et al.*, 2011). In this analysis, it is assumed that the dominant relationship has not changed with the increase in the number of beetles (Gray and Head, 2001). The curves obtained suggest the presence of most of the taxonomic levels (family, genus, order) in all the samples that did not reach the growth. Comparison of the estimated richness indicated that some phylotypes were lost. Among the beetles studied from both populations, the most complex intestinal microbiota was found in individual F_2 and the least diversity was found in individual A_1. These results could be related to the food source as the acorn has a more or less stable composition. However, faeces composition is very diverse and can contain complex substances whose degradation requires a more complex flora.

The Detrended Correspondence Analysis (DCA) is a multivariate technique used in ecology in order to explore the patterns of variability in a community. The distribution observed in our study between bacterial samples (Figure 6) demonstrated that beetles

were interconnected within the same quadrant in which, the axes correspond to CA1 of -0.5 to 0. One exception was the case of the beetle F_1 that was very distant from the rest of the samples within the axis of abscissas of 0 to 2.0. The groups formed were of a mixed composition. There was not a specific cluster associated with the acorn or the faeces diet. The observed homogeneity among the population fed on acorns and the heterogeneity among those fed on faeces was expected due to the different composition of the food. By looking at the dendrograms at the order, family and genus levels, an effect equal to the data in cluster dendrograms was observed (Figure 7). As in the case of the DCA heatmaps, no specific clusters could be associated with a specific diet. The sample having the larger number of species was F_3, which was from the population being fed on faeces. The heterogeneous cluster consisted of A_1, A_2, A_3, and F_3 while the homogeneous one consisted of F_1 and F_2. In the case of order and family dendrograms, there was a relationship between the samples but no specific groups were observed. In general, the observed diversity in the gut of these beetles was high and heterogeneous and only some of these microorganisms were correlated to a specific diet. However, the diet was not the only factor involved and others such as age, stage in the life cycle, the action of acid producing fungi, and the presence of bacteriostatic antimicrobials in the environment, could also be responsible for the observed patterns. Therefore, it was not possible to separate the samples into two specific clusters using the DCA analysis, as previously we had observed in dendrograms and barplots. Results of the diversity index showed that diversity was higher among beetles fed on acorns while the abundance index showed that those fed on faeces had more abundance. This finding contradicts our expectations and it could be due to a bias related with the capacity of the pyrosequencing technique to get information from non-culturable bacteria. The difference in the diversity could be explained taking into account that dung is a nutritionally incomplete diet that consists of 86% cellulose and that lacks amino acids essential for insect metabolic needs such as tryptophan, methionine, phenylalanine, histidine and arginine (Fraenkel and Printy, 1954), so the trend of these specimens is towards not to having a diverse but a specialized microbiota .

The relationship between the microbes living in the gut and the diet is very important since some of them could be involved in metabolizing (catabolism and anabolism) different compounds present in the diet. Both diets assayed in this study are rich in lignin and poor in amino acids. The *Q. ilex* acorns had a lignin content of 30,2% in their shells and 2% in the seed. These lignin molecules normally are not digested by the beetles due to lack of proper enzymes to do so (Rodríguez-Estévez *et al.*, 2008). The amount of lignin in faeces is variable since it depends on the diet of the animal of origin and its availability in the faeces (Scully *et al.*, 2013). In these animals, lignin degradation is achieved through animal-derived enzymes such as the lacase that is endogenously present in termites and it can modify and degrade lignin phenols. This is a great example of how bacteria can enhance the digestive activity in the host. Other studies have also noted that the presence of different fungi in the dung affects digestion in the host (Estes *et al.*, 2013). For dung beetles, the fungus *Fusarium spp.* was observed to synthesise enzymes itself (Pauchet *et al.*, 2010; Aw *et al.*, 2010; Keeling *et al.*, 2013). The fixed microbiota of *T. lusitanicus* found in different conditions could be enhancing the production of enzymes related to lignin degradation or alternatively the bacteria/fungus could be creating these enzymes themselves. Due to the lack of abundance of amino acids in dung and acorns, especially essential amino acids such as glutamine and asparagine, these beetles could accommodate microorganisms that can produce amino acids in order to enhance their dietary intake.

By comparing the diversity data obtained through different analytical methods, we can conclude that the data depended on the methodology being used. This means that every method has a bias that makes the results non-objective. This in turn highlights the importance of obtaining results from several methods. In our study, the DGGE and Sanger sequencing techniques showed that the more diverse microbiota was found in beetles fed on faeces. Pyrosequencing, on the other hand, showed us that the higher diversity in terms of genus was found among beetles fed on acorns, but the higher number of species was found among those fed with a faeces diet. This finding allows us to say that the beetles that were fed on faeces had higher species diversity that was not corresponded at the genus level. Mahowald *et al.* (2009) addressed the content of microbiota in gnotobiotic mice, and focused on the

relationship between two species belonging to the Firmicutes and Bacteroidetes phyla, respectively. These species showed mutualism since both showed a clear benefit from the relationship. The genome of the Bacteroidetes species contains a disproportionately large number of genes encoding glycan-degrading enzymes as compared to that belonging to Firmicutes. Bacteria belonging to Firmicutes respond to the increasing microbial diversity by modulating the expression of their wide array of polysaccharide utilization *loci*. Therefore, it was observed that a specific species adapts itself to the presence of another one by up-regulating or down-regulating specific *loci* in a way such that both species would benefit. It could be safely said that mutualism is the main reason for the presence of bacteria within the gut and inside cells (in the case of endosymbionts). This relationship could have great advantages in terms of increasing the capacity to adapt to the environment and its changes. Moreover, some studies addressing the profiling of the transcriptome of coleopterans have shown that some organisms merge into a single organ following down-regulation of expression of certain genes (Scully *et al.*, 2013; Pauchet *et al.*, 2010; Aw *et al.*, 2010; Keeling *et al.*, 2013). These studies show that coleopterans have endogenous digestive and metabolic capabilities and can produce enzymes that degrade the cell-wall as well as detoxification enzymes. However, studies have also shown that they have blocked pathways at multiple steps including the synthesis of sterols, aromatic amino acids, and branched chain amino acids. These nutrients must be acquired from food or through interaction with the bacteria that form the intestinal microbiota. Our findings, in terms of diversity and abundance of microbiota in the gut of *T. lusitanicus*, show that it is necessary to further study these parameters using other techniques and under variable environmental conditions in order to define the composition of the core microbiota. Findings from these studies could be able to correlate the microbiota to endosymbionts. Among insects, many symbiotic relationships date back to the origin of major taxonomic groups and whole insect families, implying several millions of years of association. Among the groups shown to have bacteriocyte-associated symbionts are the aphids (Munson *et al.*, 1991), tsetse flies (Chen *et al.*, 1999), cockroaches (Lo *et al.*, 2003), whiteflies (Thao and Baumann *et al.*, 2004), psyllids (Thao *et al.*, 2000), mealybugs (Baumann *et al.*, 2002), weevils (Lefevre *et al.*, 2004), and carpenter ants (Degnan *et al.*, 2009; Schröder *et al.*, 1996).

Future studies should be aimed at finding the specific microbiota (free or endosymbiotic) and the related candidate genes that are involved in degrading the majority of the compounds present in dung and acorns

Acknowledgments

This study was supported by the project “NiTerDist” (CGL2011-515 25544) of the Secretaría de Estado de Investigación, Desarrollo e Innovación and the 64/2013 of Laboratorios Ovejero S.A.-Universidad Complutense de Madrid. Dr. Rafael Zardoya from the National Museum of Natural Sciences is gratefully acknowledged for providing insightful comments. N.H. was pre-doctoral student of the INIA-MCI. Thanks to Elie Dahdouh for the contribution in this study.

Table I. Primers used in 454-pyrosequencing. Underlined sequences in the primers are the base pairs conserved in the V3 region of the *16S rRNA* gene. Primers were chosen randomly.

Primer	Sequence	Sample
EM-F-1	<u>tcacacgacg</u> actagagtttgatcmtggctcag	F_3
EM-R-1	<u>tcacacgacg</u> acttgctgcctcccgtaggagt	F_3
EM-F-4	<u>tcacgacacg</u> tatagagtttgatcmtggctcag	A_1
EM-R-4	<u>tcacgagtag</u> acttgctgcctcccgtaggagt	A_1
EM-F-7	<u>tcacgtacac</u> actagagtttgatcmtggctcag	A_2
EM-R-7	<u>tcacgtacac</u> acttgctgcctcccgtaggagt	A_2
EM-F-10	<u>tcactacgtc</u> tctagagtttgatcmtggctcag	A_3
EM-R-10	<u>tcactacgtc</u> tcttgctgcctcccgtaggagt	A_3
EM-F-11	<u>actatacgag</u> tagagtttgatcmtggctcag	F_1
EM-R-11	<u>actatacgag</u> ttgctgcctcccgtaggagt	F_1
EM-F-12	<u>actcgctcgt</u> agagtttgatcmtggctcag	F_2
EM-R-12	<u>actcgctcgt</u> ttgctgcctcccgtaggagt	F_2

Table II. Absolute percentages of presence of each bacterial phyla in the 374 analyzed sequences derived from the clone libraries.

Phylum	Times	Percentage
Bacteroidetes	36	9,62
Actinobacterias	16	4,28
Firmicutes	64	17,11
Proteobacteria	248	66,31
Total	374	

Table III. Distribution of genera in the two populations fed on acorns and faeces, respectively. There are genera specific to a diet, as well as a core microbiota that is shared by both populations regardless of type of food.

Acorns	Taxonomic group	Sharing	Taxonomic group	Faeces	Taxonomic group
<i>Obesumbacterium</i>	Enterobacteria	<i>Serratia</i>	γ -Proteobacteria	<i>Vagococcus</i>	Firmicutes
<i>Ochrobactrum</i>	α -Proteobacteria	<i>Carnobacterium</i>	Firmicutes	<i>Dysgonomonas</i>	Bacteroidetes
<i>Enterococcus</i>	Firmicutes	<i>Sphingobacterium</i>	Bacteroidetes	<i>Providencia</i>	γ -Proteobacteria
<i>Oerskovia</i>	Actinobacteria	<i>Leucobacter</i>	Actinobacter	<i>Tisierella</i>	Firmicutes
<i>Tetrathiodacter</i>	β - Proteobacteria	<i>Vitreoscilla</i>	β -Proteobacteria	<i>Comamonas</i>	β -Proteobacteria
<i>Pantoea</i>	γ -Proteobacteria			<i>Budvicia</i>	γ -Proteobacteria
				<i>Arthrobacter</i>	Actinobacteria
				<i>Erysipelothrix</i>	Firmicutes
				<i>Myroides</i>	Bacteroidetes
				<i>Paraferrimonas</i>	γ -Proteobacteria

Table IV. Table of indices of diversity and abundance. Observed richness, Chao1 richness estimator (with the standard error, SE), and Shannon diversity index (H) for each sample.

Samples		A_1	A_2	A_3	F_1	F_2	F_3
Order	Orders	22	43	33	27	49	39
	Chao1	29,5	50,5	37,67	34	53,2	48
	Chao1(SE)	23,62	8,37	5,92	13,15	6,08	12,46
	Shannon H	0,97	1,23	2,29	1,59	1,16	1,7
Family	Families	35	76	59	48	100	79
	Chao1	48,75	93,5	66,8	65,5	119,43	91,36
	Chao1(SE)	17,42	11,54	6,8	16,09	16,04	9,19
	Shannon H	0,99	1,43	2,76	1,7	1,6	1,94
Genus	Genera	58	136	117	82	192	157
	Chao1	91	179,12	134,4	137,11	257,62	222,62
	Chao1(SE)	24,64	17,94	8,96	32,98	26,25	26,25
	Shannon H	1,6	2,42	3,47	1,9	2,08	3,16

Table V. Taxonomic composition of the samples (percentage of sequences belonging to each bacterial family).

Class information (*): Ba, *Bacilli*; C, *Clostridia*; F, *Fusobacteriia*; A, *Alphaproteobacteria*; B, *Betaproteobacteria*; G, *Gammaproteobacteria*; M, *Mollicutes*; U, Undetermined

Phyla	Class (*)	Orders	Genera	A_1	A_2	A_3	F_1	F_2	F_3
<i>Firmicutes</i>	Ba	<i>Lactobacillales</i>	<i>Carnobacterium</i>	0	0,079	0	2,62	0,01	0,19
			<i>Enterococcus</i>	1,77	2,92	0	0,76	0,10	1,018
			<i>Lactococcus</i>	0	0,35	0	1,012	0,01	0
			<i>uc_Bacillales</i>	0,098	0,053	0	6,31	0,19	0,13
	C	<i>Clostridiales</i>	<i>uc_Clostridiales</i>	0,022	0,066	0,053	7,65	0,12	0,38
<i>Firmicutes</i>	U	Undetermined	<i>uc_Firmicutes</i>	0,48	0,25	0,053	60,55	0,60	0,45
<i>Fusobacteria</i>	F	<i>Fusobacteriales</i>	<i>Fusobacterium</i>	0,022	0,91	0	0	0,51	1,50
<i>Proteobacteria</i>	A	<i>Rhizobiales</i>	<i>Bradyrhizobium</i>	0	0,093	1,28	0,15	0	0
		<i>Sphingomonadales</i>	<i>Novosphingobium</i>	0	0,106	4,58	0,033	0	0,054
		Undetermined	<i>uc_Rhizobiales</i>	0	0,027	1,71	0,017	0,05	0,21
	B	<i>Burkholderiales</i>	<i>Burkholderia</i>	0	0,70	6,88	0,017	0,01	0,080
			<i>uc_Burkholderiales</i>	0	0,15	2,13	0	0,02	0
			<i>Variovorax</i>	0	0	1,33	0	0	0,080
	G	<i>Enterobacteriales</i>	<i>Citrobacter</i>	0	0,08	0,21	0	0,02	5,14
			<i>Enterobacter</i>	0,022	3,38	0,53	2,056	0,01	5,46
			<i>Erwinia</i>	0,29	0,62	1,65	0	0,05	0,24
			<i>Kluyvera</i>	1,43	0,56	0,21	0,066	0,02	0,46
			<i>Providencia</i>	0	0,027	0,053	0	0,03	17,20
			<i>Raoultella</i>	44,46	37,50	13,43	0,83	0,19	4,29
			<i>Serratia</i>	0,50	1,80	0,96	2,45	0,01	5,20
			<i>uc_Enterobacteriaceae</i>	18,85	20,26	12,31	7,81	0,45	23,49
			<i>Yersinia</i>	1,38	2,11	1,40	0,51	0	1,29
		<i>Legionellales</i>	<i>Aquicella</i>	0	0	2,56	0	0	0
		<i>Pseudomonadales</i>	<i>Pseudomonas</i>	0,40	2,68	0,16	0,066	0,66	5,28
		<i>Xanthomonadales</i>	<i>uc_Xanthomonadaceae</i>	0,011	0,19	1,12	0	0,04	0,11
			<i>Dyella</i>	0	0,13	3,62	0,017	0,01	0,053
		Undetermined	<i>uc_Gammaproteobacteria</i>	0,50	0,52	2,35	0,38	0,32	2,20
	U	Undetermined	<i>uc_Proteobacteria</i>	0,20	0,28	3,039	0,61	2,73	1,77
<i>Tenericutes</i>	M	<i>Entomoplasmatales</i>	<i>Spiroplasma</i>	26,62	0,053		0,23	0,02	0,027
Undetermined	U	Undetermined	<i>TM7_genera_incertae sedis</i>	0,044	0,29	5,38	0,017	4,50	0,48
Undetermined	U	Undetermined	<i>Others</i>	1,63	5,98	17,75	5,39	7,41	17,14

Figure 1. (A) Bimimensional matrix. The presence of bands is marked with 1 and the absence of bands with 0. Samples 1 from to 7 belong to the population fed on an acorn diet, samples from 8 to 14 belong to the population fed on a faeces diet (markers of the DGGE gel were not taken into account). (B) DGGE fingerprint. Each lane shows a specific sample. Samples from both populations are shown. Lanes 1 and 20 are empty while lanes 2 and 19 have specific markers. Lanes 3 to 9 are of beetles fed on acorns and 10 to 18 are of those fed on faeces.

Bands	Samples													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
3	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1
4	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0
5	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0
6	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
7	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
8	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
9	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1
10	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1
11	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1
12	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
13	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0
14	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1
15	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1
16	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1
17	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
18	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1
19	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1
20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1
22	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1
23	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1
24	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1
25	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1
26	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
27	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0
28	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0
29	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1
30	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1
31	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
32	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	1
33	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1
34	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1
Total	6	4	5	4	4	17	13	13	26	13	23	10	9	19

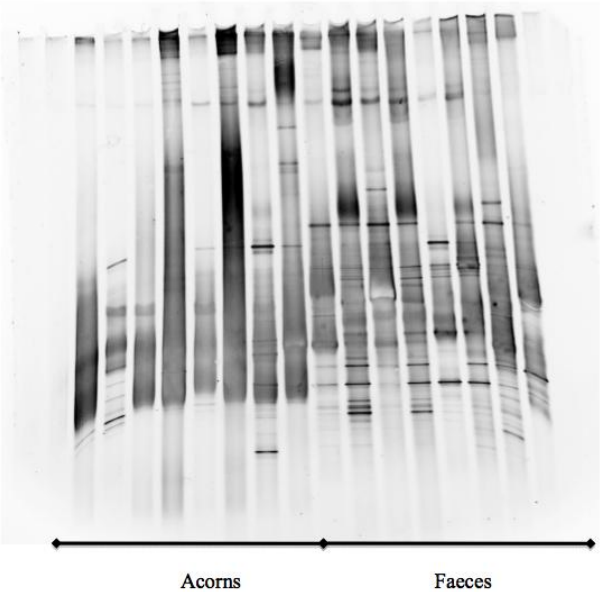


Figure 2. Relative abundance. The relative abundance of the phyla associated with a specific diet is shown.

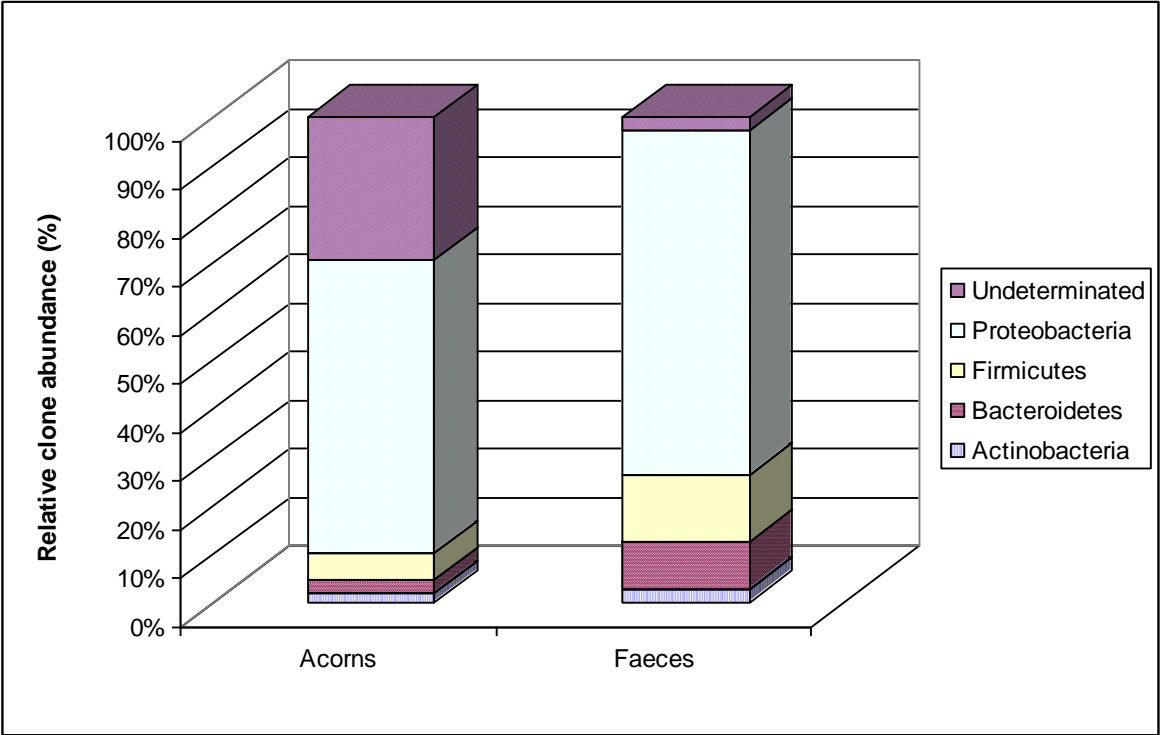
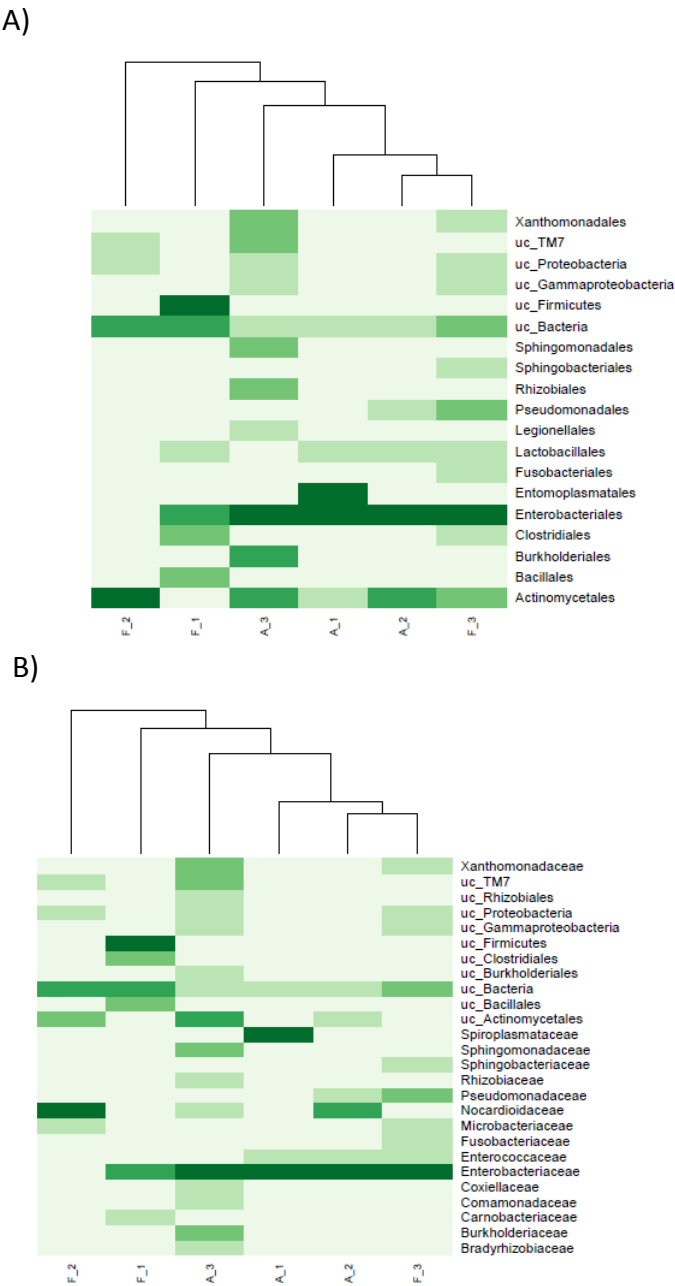


Figure 3. Barplot and hierarchical cluster grouping functions according to the estimated taxa distribution profiles: A) Heatmap at the (A) order, (B) family, and (C) genus levels.



c)

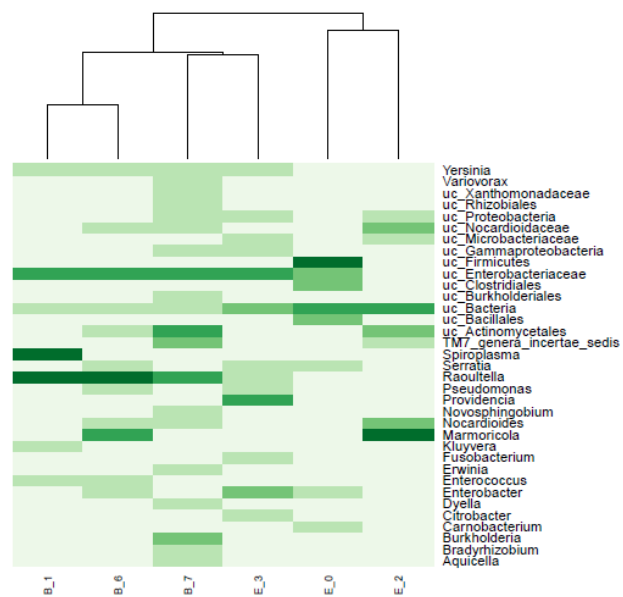


Figure 4. Composition of active microbiota. The composition for each sample is based on the taxonomic assignment of sequences of the *16S rRNA* gene.

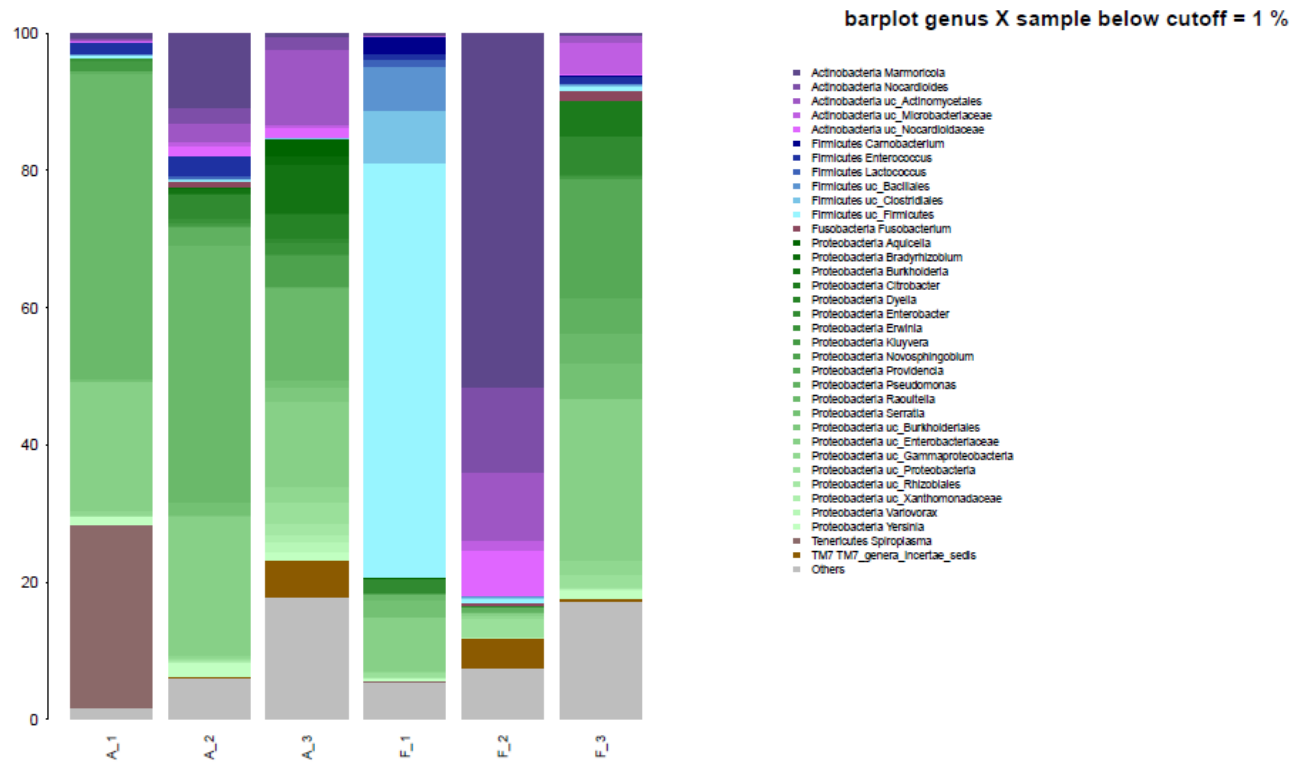


Figure 5. Detrended Correspondence Analysis (DCA) based on phylotypes of each sample in order to detect the taxonomic relationship between diets.

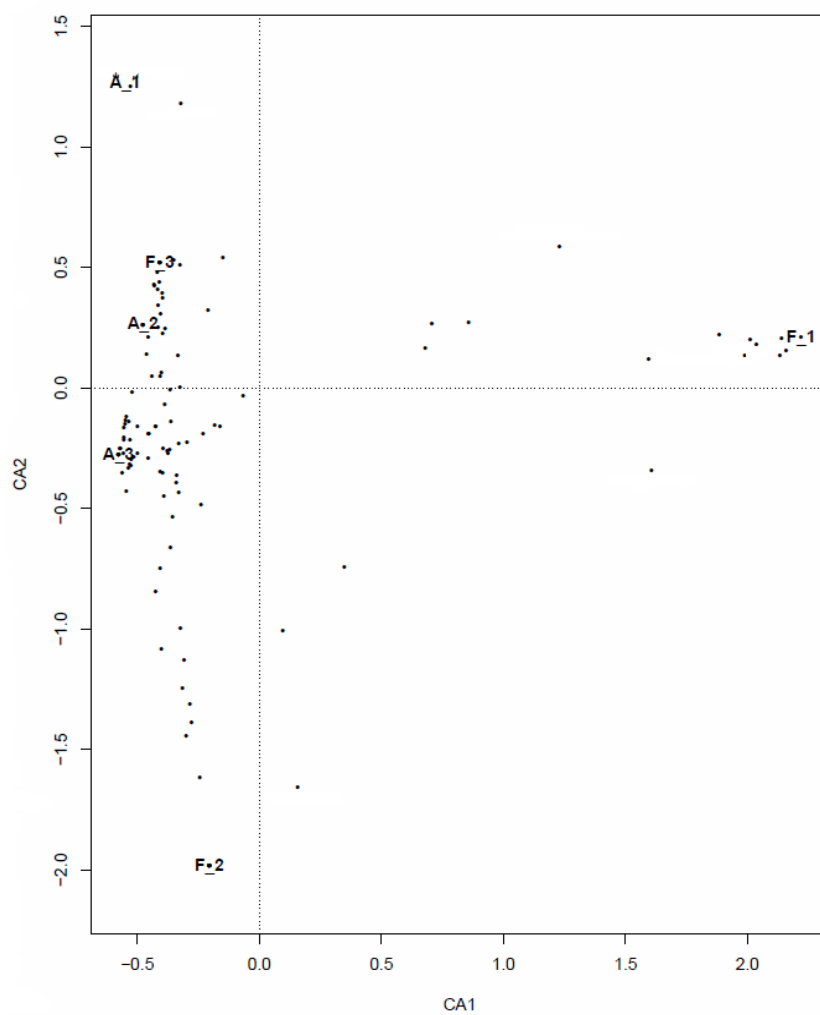
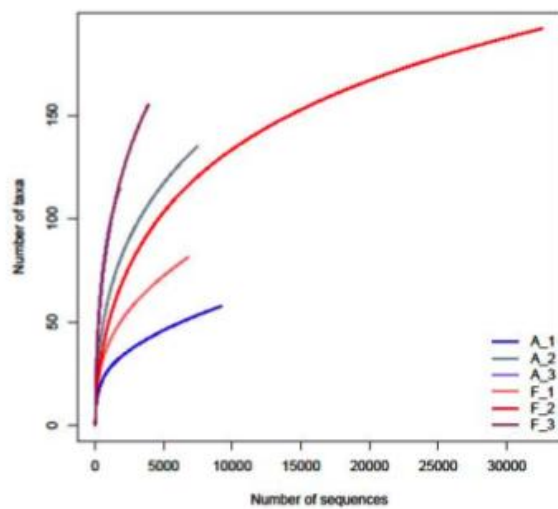
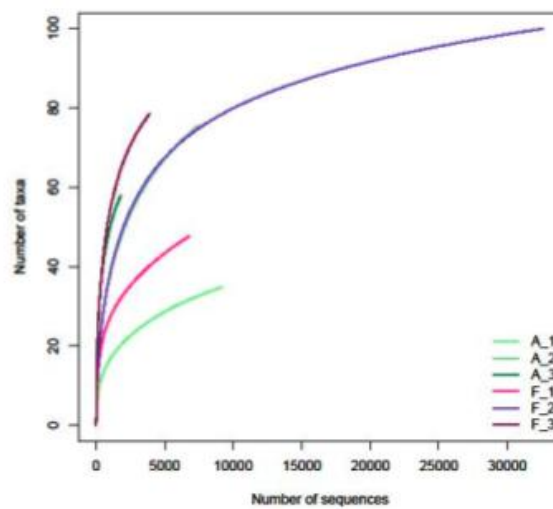


Figure 6. Rarefaction curves calculated at: A) Order. B) Family and. C) Genus levels.

A. Orders



B. Families



C. Genera

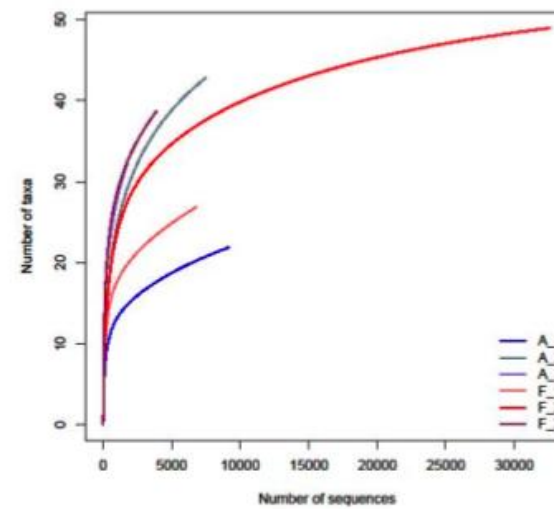
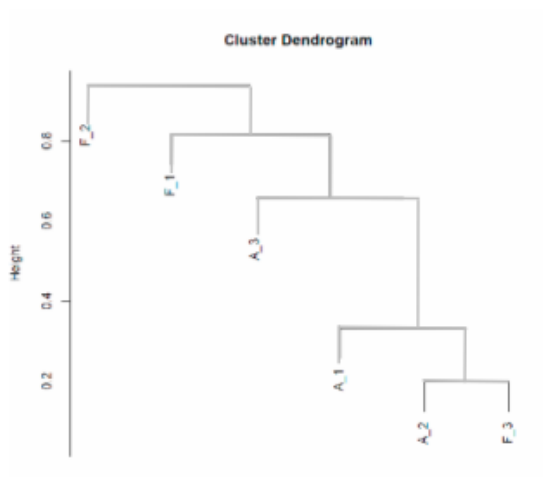
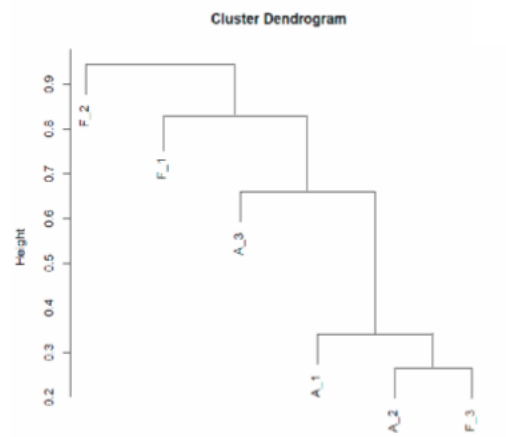


Figure 7. Cluster dendrograms. Hierarchical cluster grouping according to:

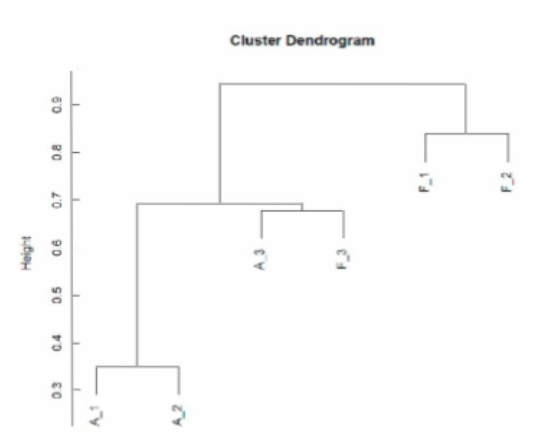
A. Orders



B. Families



C. Genera



CAPÍTULO III

The role of the dung beetle *Thorectes lusitanicus* (Coleoptera, Geotrupidae) as a potential vector of infectious diseases

Noemi Hernández, Laura Carrilero, José R. Verdú, Jorge M.L obo, Bruno González-Zorn y Mónica Suárez

Artículo enviado a *Medical and Veterinary Entomology*

Resumen

Las interacciones entre los animales estabulados y los animales salvajes tienen una gran relevancia para el ecosistema, la salud humana y veterinaria. Las medidas de control en la transmisión de enfermedades debería de ser usada para reducir la frecuencia de enfermedades que afectan a los animales estabulados especialmente porque eso se traduce en grandes costes económicos y en la transmisión de serias enfermedades tanto a animales y humanos. En este estudio, identificamos las cepas que eran potencialmente importantes desde un punto de vista económico dentro de la microbiota intestinal del escarabajo *Thorectes lusitanicus* (*Geotrupidae*), que es endémico del sur de la Península Ibérica. Tales bacterias pueden desarrollar resistencia a antibióticos, de modo que pueden producir la expansión de resistencia en el medio usando al escarabajo como un vector que puede estar en contacto con animales tanto de producción como salvajes. Se analizó un total de 10 cepas que se encuentran implicadas con conocidas enfermedades humanas. Una de las más destacadas era la cepa enterohemorrágica *Escherichia coli* O26: H11 que fue encontrada por primera vez en este escarabajo. Cuatro de las cepas mostraron ciertos niveles de resistencia a antibióticos, *E. faecium*, *E. amnigenus* y *P. putida* eran resistentes tetraciclina, amoxicilina-clavulánico y ampicilina, respectivamente. Estos resultados sugirieron que *T. lusitanicus* podría ser considerado como un transmisor potencial de enfermedades infecciosas en mamíferos, y también como factor de la diseminación de la resistencia a antibióticos.

Abstract

Interactions between livestock and wild animals are of high relevance to public health and farmers, alike. Control measures in disease transmission should be followed in order to reduce the prevalence of diseases affecting livestock, especially since some can have large negative economic impacts and cause serious illnesses in animals and humans. In this study, we identify the bacterial strains that are potentially important from a medical and veterinary point of view present in the gut of a dung beetle, *Thorectes lusitanicus* (Geotrupidae), an endemic species of the southern part of the Iberian Peninsula. Moreover, we determined the resistance profiles of these bacterial strains and found that ten of them are implicated in known human diseases. Four of these isolated bacterial strains showed antibiotic resistance: *Enterococcus durans*, *Enterococcus silesiacus*, *Enterobacter amnigenus*, and *Pseudomonas oryzae* were resistant to tetracycline, vancomycin, ampicillin and amoxicillin-clavulanate, respectively. All the strains showed susceptibility to tigecycline. In addition, the enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26: H11 strain was isolated for the first time from this beetle. These results suggest that *T. lusitanicus* could be considered a potential transmitter of infectious diseases to mammals, and also a dissemination vector for antibiotic resistance.

Introduction

The control of dissemination of infectious diseases, specially the zoonoses, is one of the main objectives of international health associations such as the World Health Organization. Mullen and Durden (2002) showed that some insect species could serve as an essential vector for the transmission and dissemination of infectious diseases in animals, leading to heavy economic losses and serious human illnesses. The increased translocation of animal products and people as well as the extensive use of antibiotics in humans and in the livestock industry stimulates a strong selective pressure capable of favouring the appearance of antibiotic resistant bacterial strains (Arias & Murray, 2009). These factors can be involved in the transmission of antibiotic resistance genes among different species (Macovei & Zurek, 2006; Ahmad *et al.*, 2011).

Monitoring interactions between livestock and wild animals, and controlling the handling of mammalian faeces are key factors that limit infections. Since dung beetles (Coleoptera Scarabaeoidea: Scarabaeidae, Aphodiidae and Geotrupidae) are the most specialized group of insects involved in the natural management of mammalian dung (Nichols *et al.*, 2008), they may have a high potential role in the transmission and control of infectious diseases. The relevance of dung beetles as damaging and reducing agents for helminths and protozoans has been widely recognized long time ago (Ransom & Hall, 1917; Miller *et al.*, 1961; Fincher, 1975; King & Monis, 2006; Bryan *et al.*, 2009; Ryan *et al.*, 2011). This role does not seem to show any specificity since it is widely distributed among biogeographic regions and taxonomic groups (Halffter & Matthews, 1966). Dung beetles may become infected by feeding on faeces and mammals could acquire pathogens as they eat these beetles. However, there is very scarce empirical evidence for this transmission (Jessee *et al.*, 1970; Araki *et al.*, 1977; Machida *et al.*, 1978) and other passive infection routes seem to have a higher likelihood (Tompkins *et al.*, 2012; Mackereth *et al.*, 2013). The role of dung beetles as infecting and disseminating agents can be favoured by their burrowing and burying capacity (Fincher, 1981, Nichols *et al.*, 2008). Nevertheless few data exists on the capacity of these species as probable vectors of different pathogens such as protozoa (*Cryptosporidium*, *Isospora* and *Toxoplasma*; Mattison & Ditrich, 1999; Saitoh & Itagaki, 1990), nematodes (*Spirocerca lupi* and *Gongylonema*; Gottlieb *et al.*, 2011; Du Toit *et al.*, 2008; Mukaratirwa *et al.*, 2010; Mowlavi *et al.*, 2009) or bacteria such as *Escherichia coli* 0157:H7 (Xu *et al.* 2003), *Mycobacterium bovis* (Tompkins *et al.*, 2012), and *Serratia* sp., *Pseudomonas filiscindens*, *Enterobacter amnigenus*, *Proteus vulgaris* and *Ochrobactrum* sp. (Rae *et al.*, 2008). Our general lack of knowledge about the contrasting roles of dung beetles in enabling or preventing the dissemination of faecal pathogens is exemplified by the recent debate about the health benefits or risks that may arise from the introduction of imported exotic dung beetle species used to ameliorate New Zealand pasturelands (see <http://dungbeetle.org.nz>; Tompkins *et al.*, 2012; Mackereth *et al.*, 2013).

This study is aimed to increase the available knowledge on the capacity of dung beetle species in acting as potential vectors for bacterial infections diseases. We

focused on *Thorectes lusitanicus* (Jeckel), a Geotrupidae species that is endemic of the Iberian Peninsula. This species is characterized by consuming a high variety of trophic resources and by its capacity to act as a secondary seed disperser in Mediterranean oak forest (Pérez-Ramos *et al.*, 2007; Verdú *et al.*, 2007, Verdú *et al.*, 2010). We isolated the culturable, aerobic, facultative anaerobic, and aerotolerant bacteria present in the gut of this species in order to i) identify the potentially important strains from a medical and veterinary point of view, and ii) determine the resistance profile of these bacterial species.

Materials and methods

Collection of the beetles

The studied beetles were collected from the oak forest of the Aljibe Mountains in the southern Iberian Peninsula (Spain and Portugal). The climate is Mediterranean-type, with wet winters and dry summers. Vegetation is dominated by evergreen cork oak forests (*Quercus suber*) and deciduous oaks (*Q. canariensis*) mixed with arborescent shrub (*Arbutus unedo*). Around 1700 km² of the forested area has been protected as a reserve called “Natural Park of Los Alcornocales”.

Thorectes lusitanicus (Coleoptera, Scarabaeoidea, Geotrupidae) is a medium-size dung beetle, endemic of the southern Spain and Portugal (Martín-Piera & López-Colón, 2000). Its life cycle begins in the autumn, when females lay the eggs in the faeces of herbivores such as deer, sheep, goat, rabbit and cattle. The adults will then emerge in spring. Due to the consumption of acorns during the breeding period, *T. lusitanicus* is a relevant source of proteins and lipids (Verdú *et al.*, 2010) to several mammal predators such as red foxes, common genets, barn owls, and Eurasian eagle-owls (personal observations).

Isolation and identification of bacteria

The midgut and hindgut of 12 specimens of *T. lusitanicus* were extracted under sterile conditions. The samples were then homogenized in a sterile saline solution with

a dilution factor of 1/10 w/v. The homogenate was then plated on Brain-Heart infusion agar (BHI) and McConkey agar (Biomérieux) and incubated at 30°C for 24 hours. The bacteria were differentiated according to their morphology, colour and brightness of the colonies. Bacterial colonies were subsequently isolated and conserved at -20°C in a milk medium containing glycerol.

Isolated culturable, aerobic, facultative anaerobic, and aerotolerant bacteria were identified after DNA extraction followed by sequencing of the 16S *rRNA* gene. This gene was amplified by PCR using the following primers: 16S forward (5'-AAGAGTTTGATCATGGCTCA) and 16S reverse (5'-GTTGCGCTCGTTGCGGGACT). The final 25 µl PCR mix contained: 10 ng of DNA from isolated bacteria, 2.5 µl (1x) of buffer (MgCl₂ added at 2.5 mM final concentration), 0.5 µl (0.4 µM) of each primer, 1 µl of dNTPs (0.4 mM of each), and 1.5 µl *Taq* polymerase (1.5 U). The reaction conditions were 95 °C for 10 minutes, 30 cycles of 60 seconds at 95 °C, 60 seconds at 52 °C, and 120 seconds at 72 °C, and a final extension at 72 °C for 10 minutes. PCR products were purified using the QIAquick PCR purification kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). Amplification products were analysed by electrophoresis in a 1.5% (w/v) agarose gel containing SYBR Safe™ DNA gel stain at a concentration of 1 ng/ml (Invitrogen, Oregon, USA).

Analysis of sequences

The integrity of the PCR products was checked by electrophoresis and sequenced in a SECUGEN S.L., using a BigDye[®] Terminator v3.1 genetic analyser. The sequences obtained were edited by Chromas (v. 1.4.3., Faculty of Science, Griffith University, Australia) and aligned using the BioEdit Sequence Alignment Editor program (v. 7.0.8.0; Hall, 1999). Sequences were compared with the BLAST database (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) using the criteria of "Collection Nucleotide" (nr/nt) and the greatest similarity possible. The selected bacteria for further studies were those having the similarity of the 16S *rRNA* gene between 83 to 100% with known bacteria (Hernández *et al.*, 2013).

Antibiotic resistance

The antibiotic resistance profile was determined by disk diffusion method and E-test (Epsitomer-test). The tests were standardized by qualitative and quantitative methods that ensure a pure and consistent culture of bacteria. These techniques were described and standardized by the EUCAST (European Antibiotic Susceptibility Testing Committee on, 2011) and the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).

The isolated bacteria that may have potential in causing disease were spread into BHI agar plates and incubated at 28°C for 24 hours. The results were analysed after 24 hours and 48 hours of incubation. All the bacteria were tested for broad spectrum antibiotics depending on their Gram staining. The specific antibiotic for Gram-positive bacteria were penicillin 10 µg (Biodiscs), erythromycin 15 µg (BD Sensi-Discs), vancomycin 30 µg (Biodiscs) and ampicillin 10 µg (Biodiscs). The antibiotics used for Gram-negative bacteria were imipenem 10 µg (Biodiscs), amikacin 30 µg (Biodiscs) and sulfonamide 10 µg (Biodiscs). All bacteria were also tested with tetracycline 30 µg (Biodiscs), gentamicin 10 µg (Biodiscs), amoxicillin-clavulanate 30 µg (Biodiscs), tigecycline from 0.256 to 0.016 µg/ml (Biomérieux), cefotaxime 30 µg (BD Sensi-Discs) and ciprofloxacin 5 µg (BD Sensi-Discs). All antibiotics were used as disks, with the exception of tigecycline that was used as an E-test strip.. The diameter of the inhibition zone was compared to the breakpoints provided by both, the EUCAST and the CLSI. The MIC (minimal inhibitory concentration) of tigecycline was determined by the E-test.

Results

Bacterial identification

Using an arbitrarily defined limit of 99.5% BLAST sequence similarity, we could attribute a minimum of 43 OTUs (Operational Taxonomic Units) to species described in the NCBI database (Hernández *et al.*, 2013). The isolated bacteria that were relevant to animal and public health were: *Enterococcus durans* *Enterococcus silesiacus*,

Lactococcus garvieae, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus casseliflavus*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia coli* O26: H11, *Shigella flexneri*, *Pseudomonas oryzihabitants* and *Enterobacter amnigenus* (Table 1).

Antimicrobial resistance

Table 2 shows the diameters corresponding to the inhibition zones of the different antibiotic disks used (Fig. 1) at 48 hours of incubation. The exception was tigecycline since the E-test was used. From the ten different clinically important isolated strains, four showed resistant profiles: *E. durans*, *E. silesiacus*, *P. oryzihabitants*, and *E. amnigenus*.

Enterococcus durans showed an intermediate resistance to tetracycline shown by an inhibition zone close to the threshold (11 mm). *Enterobacter amnigenus* showed a resistance to amoxicillin-clavulanate with a diameter of 14 mm (the threshold is 17 mm), and a probable low level of resistance to ampicillin showed by an inhibition zone of 14 mm in diameter. A high resistance to ampicillin was found in *P. oryzihabitants* (6 mm diameter inhibition zone). Resistance to sulfonamide was also evident in this strain. Significant variations in resistance levels were observed among strains of the same species; for example a great difference in susceptibility to tetracycline was shown between *E. durans* and *E. casseliflavus*. By comparing the MICs to the Data TEST (Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial; see www.testsurveillance.com/) guidelines, all the strains showed susceptibility to tigecycline. The strains of *L. garvieae* and *L. lactis*, due to the qualitative character of the disk diffusion method, showed a resistance to penicillin with halos of 27 and 28 mm, respectively.

Discussion

In this study, we isolated ten strains of veterinary and medical relevance from the gut of *T. lusitanicus*. These isolates were identified as belonging to the *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, and *Enterobacter* genera. None of these ten strains had been formerly identified in the gut of dung beetles (Xu *et al.* 2003; Tompkins *et al.*, 2012; Rae *et al.*, 2008), suggesting that the microbiota present

in these insects capable of causing infection diseases could be far greater than previously thought. Furthermore, our results indicate that four of these strains show resistance to some antibiotics suggesting the existence of an important cross-contamination between the environment, animals and humans. This cross-contamination could be a route for the dissemination of antibiotic resistant genes.

Main characteristics of the isolated strains

E. faecium is one of the most important bacteria that cause nosocomial infections such as bacteraemia, surgical wound infection, endocarditis, and urinary tract infections (Huycke *et al.*, 1998). *E. casseliflavus* is an opportunistic pathogen that also has the potential to cause bacteraemia in humans (Choi *et al.*, 2004). Both *Enterococcus* species are considered a reservoir of antibiotic resistance genes. *L. garvieae* infection (or lactococcosis) is very important in aquaculture, where an outbreak of this disease could lead to heavy economic losses. In addition, this bacterium was described as a agent responsible for subclinical mastitis in cows and water buffalos, pneumonia in pigs and different human diseases such as urinary tract infections, pneumonia, endocarditis and septicaemia (Vendrell *et al.*, 2006, Tejedor *et al.*, 2011, Chan *et al.*, 2011). Antibiotic-resistance to quinolones and macrolides has been described in strains isolated from fishes and bovine milk, (Maki *et al.*, 2008). In the case of other bacteria belonging to *Firmicutes* phylum, *L. lactis*, in humans, has been associated with endocarditis (Mannion and Rothburn, 1990) and has also been isolated from clinical samples of blood, skin lesions, and urine (Facklam *et al.*, 1990; Elliot *et al.*, 1991). Goyache presented the first microbiologic evidence for infection produced by *L. lactis* in waterfowl (2001).

Conflicting reports exist about the pathogenicity of *E. amnigenus* (Capdevila *et al.*, 1998). This bacterium is associated with some nematodes inhabiting *Geotrupes* species (Rae *et al.*, 2008). *P. putida*, is a ubiquitous bacteria that has been occasionally associated with clinical infections in pre-mature babies (Perz *et al.*, 2005).

Undoubtedly the most important finding is the isolation of the *Escherichia coli* O26:H11 strain. *Escherichia coli* is perhaps the most studied prokaryotic organism due

to that its natural habitat is the intestine of healthy mammals. Normally, this bacterium is necessary for the proper functioning of the digestive process where it acts as a part of the commensal intestinal flora facilitating the absorption of nutrients. Nevertheless, some serotypes have proven to be pathogenic. One such serotypes is the strain O157:H7. Strains with this serotype have previously been isolated from the dung beetle *Catharsius molossus* (Xu *et al.* 2003) and were found to be responsible of hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome. Of the three *E. coli* strains that are potentially important from a veterinary and medical point of view (Croxen *et al.*, 2013), we isolated in this study for the first time the enterohemorrhagic strain O26:H11 in the gut of a dung beetle species. This strain has been recently considered as one of the most common and emerging strains causing human diseases in Europe and USA (Bielaszewska *et al.*, 2013), due to the presence of a phage that encodes a verotoxin which in acts on the colon and leads to several symptoms, e.g.:hemorrhagic colitis, hemolytic uremic syndrome, and thrombotic thrombocytopenic purpura. Within the same genus, it is important to highlight *E. fergusonii* which is an emerging human and animal pathogen that has been associated with acute cystitis (Savini *et al.*, 2008), wounds (Mahapatra *et al.*, 2005), cancer in humans (Lai *et al.*, 2011) and diarrhea in animals (Hariharan *et al.*, 2007). In the case of animals, multidrug-resistant *E. fergusonii* has been isolated from chickens (Forgetta *et al.*, 2012), pigs (Rayamajhi *et al.*, 2011) and humans (Savini *et al.*, 2008). Phylogenetically so close, we found *S. flexneri*. It is a rare inhabitant in the gut that rarely causes lethal bacteremia in immunocompromised patients especially in patients with AIDS (Hitateguy *et al.*, 2014) there is no evidence of infection in animals. Most of the strains of *S. flexneri* are resistance to multiple antibiotics such as: ampicillin, streptomycin, chloramphenicol (Madiyarov *et al.*, 2010).

Another bacteria isolated from the gut of *T. lusitanicus* have an important role in the field of animal health and medicine. One of them, *E. durans*, in domestic animals appears to be relative rare inhabitant of the gut. Strains of *E. durans* have got involved with diseases in infant rats (Etheridge and Vonderfecht, 1992), foals (Tzipori *et al.*, 1984), kittens (Lapointe *et al.*, 2000), dogs and dog pups (Collins *et al.*, 1988), and piglets (Cheon and Chae, 1996). Also, it was an interesting findings isolated *P.*

oryzihabitans. This bacterium is a nosocomial pathogen related to infectious diseases in pediatric immunocompromised patients. It was isolated in blood, kidneys, producing bacteremia (Castagnola *et al.*, 2000; Kansouzidou *et al.*, 2000). The presence of this bacteria is very important because mostly is isolated from catheter producing infection of Hickman Catheter (Marín *et al.*, 2000). Majority lives in aquatic environment so it is able to isolate from different brands of bottled water so it has a close relationship with public health (Gutiérrez-Bustos *et al.*, 2009).

Resistant strains

According to Vieira *et al.* (2011), the extensive and inappropriate prescription of antibiotics for domestic animals and humans may result in the selection of antibiotic resistant bacteria and lead to their dissemination in the environment. The presence of antibiotic resistance in mutualism microorganisms could cause a large threat since these organisms can become reservoirs from resistance genes that could be transferred to other microorganisms (Salysers *et al.*, 2004; Stuart & Marshall, 2004). The transfer of antibiotic resistance genes among bacteria within the human microbiota has been demonstrated by multiple studies. Vignaroli (2011) claimed that the transfer of antibiotic resistance genes in *Enterococcus durans* species among insects and farm animals was possible. Moreover, these authors also stated that there was a possibility of a co-transfer of resistance to humans. They also showed that animal intestinal *enterococci* harbor antibiotic resistance genes.

In order to confirm this findings, Stock & Wiedemann (2002), studied the antimicrobial susceptibility of the genus *Enterobacter* showing that almost all the tested strains were susceptible to a wide range of antibiotics, and hypothesizing that bacteria from different origins could mix and exchange genes in a aqueous environment, facilitating the dispersion and evolution of resistance genes (Baquero *et al.*, 2008). In the case of dung beetles, the bacteria present in their guts could come in contact with animals and humans and therefore, promoting the transfer of resistance genes involved in diseases. Moreover, it is important to note that the beetle used for this study came from a region in the south of the Iberian Peninsula, where there is a

large concentration of livestock and where antibiotics could have been heavily used as growth promoters for animals.

Thorectes lusitanicus as a potential transmitter of diseases in mammals

According to the results obtained, *T. lusitanicus* can be considered as a potential vector of infectious diseases such as enterobacteriosis, enterococcosis and colicoccosis. *T. lusitanicus* could play the role of vector when this insect is ingested by several mammals predator such as red fox, common genet, barn owls and Eurasian Eagle-Owl. However, the occurrence of the pathogenic strains in the gut of a dung beetle does not necessarily imply that these species act as effective transmitter of diseases since there is no indication of any human health risks associated with dung beetles in the literature and, on the other hand, there are studies reporting that the burying activities of this species could cause a net decrease in the transport of pathogens to humans (Mackereth *et al.*, 2013). In all cases, the evidence about the transmission of pathogenic nematodes to monkeys after the consumption of dung beetles (Jessee *et al.*, 1970; Machida *et al.*, 1978) suggests caution in rejecting an active role of dung beetles in the dissemination of pathogenic bacteria.

Table 1. Gram-positive (A) and Gram-negative (B) bacteria tested for antimicrobial resistance profile.

	Nearest sequences	Percentage of similarity	Phylogenetic affiliation	Accession number
A	<i>Enterococcus durans</i> (PM7)	99	Firmicutes	HQ326787
	<i>Enterococcus silesiacus</i> (PM8)	99	Firmicutes	HQ326788
	<i>Lactococcus garvieae</i> (PM17)	99	Firmicutes	HQ326797
	<i>Lactococcus lactis</i> (PM18)	93	Firmicutes	HQ326798
	<i>Enterococcus casseliflavus</i> (PM54)	99	Firmicutes	HQ326834
B	<i>Escherichia fergusonii</i> (PM9)	99	γ-proteobacteria	HQ326789
	<i>Escherichia coli</i> O26:H11 (PM61)	99	γ-proteobacteria	HQ326790
	<i>Shigella flexneri</i> (PM11)	99	γ-proteobacteria	HQ326791
	<i>Pseudomonas oryzihabitants</i> (PM27)	94	γ-proteobacteria	HQ326807
	<i>Enterobacter amnigenus</i> (PM60)	94	γ-proteobacteria	HQ340156

Table 2. Antimicrobial resistance profile of Gram-positive (A) and Gram-negative (B) bacteria. Antibigrams were performed by the disk diffusion method to evaluate the susceptibility of bacteria to several common used antibiotics. The values correspond to the growth inhibition zone diameters (in mm). The values in brackets correspond to the antimicrobial breakpoints (provided by EUCAST and CLSI) considering the minimum diameter a strain should reach to be considered susceptible. A lower diameter indicates a resistant strain (in bold).

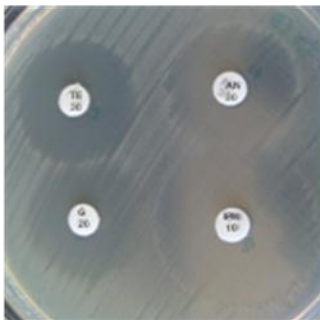
A	Specie/Strain	Antibiotics									
		TE	P	E	GM	AMC	CIP	CTX	VA	AM	TGC*
	<i>Enterococcus durans</i>	11(11)	24(15)	23(13)	20(12)	36(18)	37(21)	19(14)	26(14)	32(16)	0.03
	<i>Enterococcus silesiacus</i>	10(11)	26(15)	16(13)	16(12)	30(18)	28(21)	19(14)	20(14)	25(16)	0.02
	<i>Lactococcus garvieae</i>	27(19)	27(29)	31(21)	17(12)	33(21)	25(21)	31(23)	22(15)	32(29)	0.02
	<i>Lactococcus lactis</i>	27(19)	28(29)	28(21)	17(12)	33(21)	25(21)	32(23)	26(15)	33(29)	0.02
	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	40(11)	33(15)	22(13)	19(12)	34(18)	38(21)	20(14)	24(14)	33(16)	0.02
B	Specie/Strain	TE	IMP	AN	GM	AMC	CIP	CTX	G	AM	TGC*
	<i>Escherichia fergusonii</i>	27(19)	31(21)	25(14)	26(12)	22(17)	40(22)	35(21)	20(17)	22(13)	0.09
	<i>Escherichia coli</i> O26:H11	27(19)	31(21)	26(14)	24(12)	22(17)	38(22)	35(21)	22(17)	21(13)	0.09
	<i>Shigella flexneri</i>	26(19)	30(21)	25(14)	20(12)	22(17)	43(22)	35(21)	20(17)	23(13)	0.13
	<i>Pseudomonas oryzihabitants</i>	29(19)	42(20)	35(15)	32(15)	15(13)	42(25)	30(14)	15(17)	6(13)	0.19
	<i>Enterobacter amniqenus</i>	25(19)	30(21)	27(14)	23(12)	14(17)	44(22)	34(21)	20(17)	14(13)	1.50

*The sensitivity of tigecycline was measured by a strip of E-test and the data corresponds to the minimum inhibitory concentration (MIC) measured in µg/ml. TE, tetracycline 30 µg; P, penicillin 10 µg; E, erythromycin, GM, gentamicina 10 µg; AMC, amoxicillin-clavulanate 30 µg; CIP, ciprofloxacin 5 µg; CTX, cefotaxime 30 µg; VA, vancomycin 30 µg; AM, ampicillin 10 µg; TGC, tigecyclin (from 0.256 to 0.016 µg/ml), IMP, imipenem 10 µg; AN, amikacin 30 µg and G, sulfonamide 10 µg.

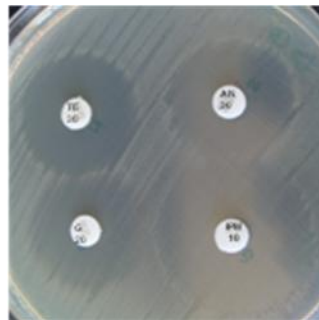
FIGURE LEGENDS

Figure 1. Susceptibility of some bacteria to antibiotics using a disk diffusion method (a, b, c) and E-test (d): a) *Pseudomonas oryzae*, b) *Escherichia coli* O26:H11, c) *Enterobacter amnigenus* and d) type E-test conducted to *Shigella flexneri*.

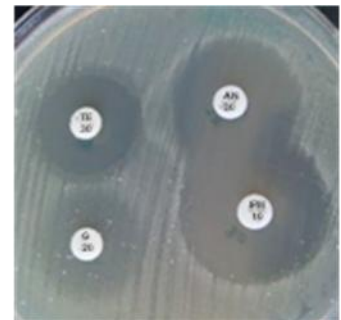
a)



b)



c)



d)



DISCUSIÓN

Los insectos polífagos son capaces de ingerir un amplio rango de alimentos, con el fin de obtener los nutrientes necesarios que requieren para su crecimiento, desarrollo y reproducción (Redfearn y Pimm, 1988). En el caso de *T. lusitanicus*, posee un comportamiento que va desde la coprofagia común en los escarabajos a la polifagia, ya que tiene como peculiaridad la posibilidad de alimentarse de bellotas de *Quercus ilex* y *canariensis*. Esta característica se puede interpretar como una estrategia de obtención de todos los beneficios del biotopo donde habita, con la máxima adaptación a su entorno, aumentando así su nicho ecológico (Verdú *et al.*, 2010). Este tipo de relación se podría referir como una simbiosis con el medio, ya que, quercíneas y coleópteros se aprovechan mutuamente, bien proporcionando alimento en el caso de los árboles o ayudando en la dispersión de semillas a lo largo de la dehesa, en el caso de los escarabajos (Pérez-Ramos, 2007). *Thorectes lusitanicus* es capaz de romper el pericarpio de las semillas y alimentarse de su fruto, con la preservación de los cotiledones que darán lugar a una nueva plántula.

Las bacterias que se localizan en el intestino de animales o el hombre dan lugar a una serie de relaciones simbióticas como por ejemplo, la degradación de metabolitos secundarios y la síntesis de vitaminas que no son capaces de sintetizarse por el individuo. Estudios recientes indican que la relación que existe es tan estrecha que de ellas depende en parte, por ejemplo, la eficacia de las moléculas usadas en la quimioterapia en pacientes con cáncer.

En el caso de *T. lusitanicus*, se relaciona la microbiota intestinal con el cambio de hábitos, la composición de la hemolinfa, el tamaño del cuerpo graso y de los ovarios (Verdú *et al.*, 2009). Este trabajo de investigación intenta establecer la relación de la microbiota intestinal con el tipo de dieta en este escarabajo peculiar que es polífago, es decir, cambia de hábitos alimentarios, como se ha indicado en la Introducción, alternando heces de mamíferos y bellotas como alimento.

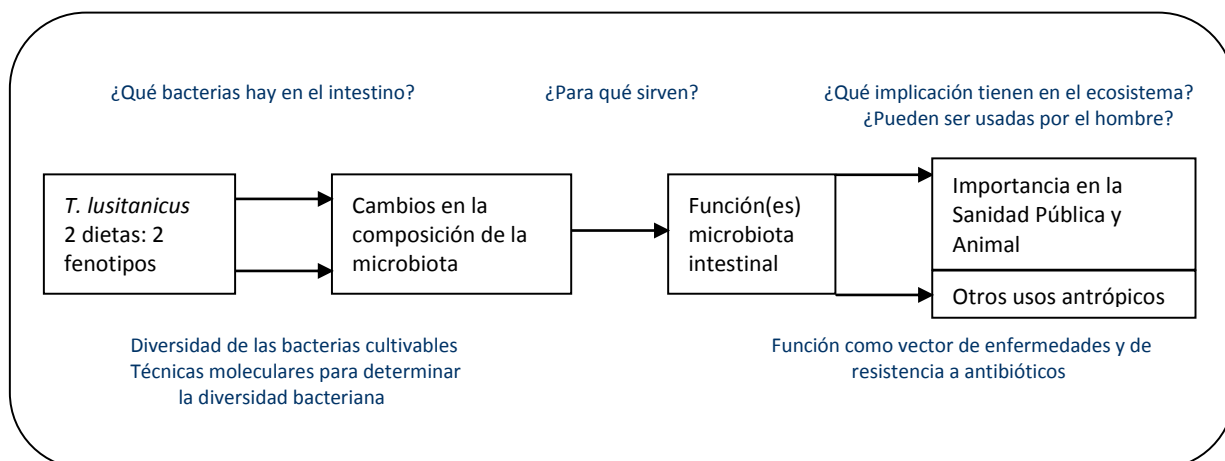


Figura 1: Resumen de las etapas acometidas en la Tesis y preguntas inherentes a cada una de ellas.

1. Diversidad genética de las bacterias cultivables.

La simbiosis microbiana existente en el intestino de los insectos es ampliamente conocida, ya que facilita el hábito alimenticio de aquéllos polívoros (Cazemier *et al.*, 1997) por lo que se esperaba, *a priori*, que en el caso de *T. lusitanicus*, existiera este tipo de relación con las bacterias que pueblan su intestino. Como ejemplos que ilustran las relaciones simbióticas entre insectos y bacterias, se puede hacer referencia a las termitas y su tipo de alimentación. Hongh (2010) determinó que en el intestino de las termitas existía una proporción de bacterias y de arqueas que oscila entre 10^6 y 10^8 , siendo en su mayoría metanógenas. Cuando se aislaron y se determinaron los géneros de las bacterias se observó que existían 3 cepas que eran mayoritarias y pertenecientes al género *Methanobrevibacter*. La función de estas bacterias es formar metano a partir de CO_2 y del H_2 .

Nos centramos en *T. lusitanicus*, escarabajo cuyos hábitos alimentarios hace que ingiera heces de mamíferos y bellotas, por lo cual podía contener una microbiota rica y compleja asociada a diferentes funciones fisiológicas (De Filippo *et al.*, 2010; Wu *et al.*, 2011). Acorde a nuestros resultados, se confirma este hecho mostrando que las bacterias cultivables son altamente ricas en términos de divergencia genética,

números de especies y rango. Los datos obtenidos se pueden comparar con especies cuyas larvas poseen intestinos en los que, por ejemplo, se fermenta la celulosa (Cazemier *et al.*, 1997).

En los estudios realizados para determinar la microbiota cultivable, en cuanto a la diversidad genética encontrada, podemos decir que numéricamente se puede comparar con la diversidad encontrada en otros escarabajos como son *Melolontha melolontha* (Egert *et al.*, 2005), *Holotrichia parallela* (Huang *et al.*, 2012; Huang y Zhang, 2013), y *Costelytra zealandica* (Zhang *et al.*, 2008), así como con la larva del insecto detritívoro *Pachnoda ephippiata* (Egert *et al.*, 2003) y algunas especies de escarabajos xilófagos (Park *et al.*, 2007). La riqueza de *T. lusitanicus* se puede considerar similar a la de otros coleópteros y otros grupos de insectos (Colman *et al.*, 2012) y se considera que está constituido por la microbiota típica encontrada en el suelo, plantas así como la procedente del intestino y las heces del ganado, como sucede en los individuos polívoros (Gayatri Priya *et al.*, 2012). Es muy diferente a la microbiota intestinal especializada de insectos como las termitas que son predominantemente bacterias con metabolismo fermentativo (Colman *et al.*, 2012).

Por medio de la secuenciación del gen *16S rARN*, de aquellas bacterias que fueron cultivables, tanto en medio aerobio como anaerobio, se determinó que el filo que poseía más representación fue el de las Proteobacterias (Stackebrandt *et al.*, 1988). Bacterias asociadas al grupo de las Clostridiales (Firmicutes) y Bacteroidales que poseen funciones en las rutas metabólicas fermentativas fueron encontrados en el intestino de *T. lusitanicus*, como también sucede en los intestinos de las larvas relacionadas con especies de escarabajos herbívoros (Egert *et al.*, 2003; Egert *et al.*, 2005; Zhang y Jackson, 2008; Huang *et al.*, 2012). En el intestino de *T. lusitanicus* pudimos encontrar géneros que en su mayoría pertenecían al orden de las Enterobacteriales, de forma más concreta a las Gammaproteobacteria (*Escherichia*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Obesumbacterium*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Providencia* y *Yersinia*) que se extienden en la mayoría de los intestinos de los animales (Behar *et al.*, 2008a; Colman *et al.*, 2012) y de los escarabajos en particular. Respecto a la representación de

los demás filos, no encontramos bacterias que pertenecieran a Bacteroidetes ni a Acidobacteria, por lo que se podría concluir que la diversidad genética es monofilética.

En resumen, la composición y riqueza de las bacterias que pueden ser cultivables del intestino de *T. lusitanicus* indican que se puede comparar con otros insectos y que, además, se encuentra al mismo nivel que la de otros escarabajos polívoros (Engel *et al.*, 2013). La riqueza bacteriana encontrada en el intestino de *T. lusitanicus* debería relacionarse con la amplia diversidad funcional, que podría permitir aprovechar los nutrientes mejor que otros escarabajos copróvoros (Shi *et al.*, 2010). Dentro de la población se encuentran bacterias que son capaces de usar la variedad de nutrientes del entorno, y presumiblemente poseen funciones específicas de la dieta, como se sugiere más adelante.

Las técnicas usadas en esta sección de la Tesis son técnicas de microbiología clásica que entendemos que aún son bastante útiles para obtener información de la diversidad de la microbiota intestinal (Hernández *et al.*, 2013). Ello permite conseguir aislar la bacteria y disponer de ella para una posible aplicación posterior. Puede ocurrir que, a pesar de que los medios son ricos y especiales para “bacterias exigentes” existan bacterias que se consideran difíciles de cultivar, ya que son muy sensibles y requieren unas condiciones muy exigentes para su crecimiento y, aunque por medio de las técnicas laborales se puedan aproximar, no crecen, impidiendo utilizar esta información.

Con el estudio de caracterización realizado en la microbiota intestinal de *T. lusitanicus* determinamos que la información está incompleta, ya que las condiciones de un intestino no son las que se presentan dentro de un laboratorio, a pesar de que se hicieron también aislamientos de bacterias anaerobias. Para poder tener unos datos irrevocables se debería simular lo más detalladamente posible las condiciones del intestino, con las variables oxígeno, pH y todas las demás, lo cual es complicado. Por ello, precisamos el uso de técnicas moleculares que tendrían como fin darnos una información global de la microbiota intestinal.

2. Uso de técnicas moleculares para el estudio de la diversidad microbiana.

El uso de técnicas microbiológicas que son tradicionales, como se ha indicado en el primer apartado no nos da una información global de la diversidad genética de la microbiota intestinal porque parte se pierde en el cultivo. Por esta razón, se determinó usar técnicas que fueran independientes de cultivo y sensibles a las variaciones. Con esto podíamos diferenciar la riqueza, atendiendo a los individuos y al tipo de dieta usada. Por lo tanto, buscamos un enfoque en el que se pudiera estudiar la diversidad bacteriana mediante tecnologías diferentes, como son DGGE y pirosecuenciación.

Empleando la técnica DGGE detectamos pequeños cambios en el contenido de las poblaciones dominantes. Además, las bandas en el gel podían ser escindidas y estudiadas individualmente, ayudando así a determinar las unidades específicas operacionales (OTUs) (Drees *et al.*, 2006; Hold *et al.*, 2002; Legatzki *et al.*, 2011; Maier *et al.*, 2010). Los resultados obtenidos fueron: (1) patrones de bandas que nos indicaban que aquellos individuos que tuvieran mayor número tendrían mayor diversidad de especies, (2) dentro de las bandas existentes se podía observar que existían bandas que se compartían en poblaciones alimentadas con bellotas y con heces, (3) otras bandas eran exclusivas de una dieta concreta. Estos datos coincidían con el estudio del gen *16S rARN* que realizamos sólo con las bacterias que eran cultivables, por lo cual podíamos hablar de una serie de bacterias que formaban un *core* o núcleo que eran constantes y otras que fluctuaban y que dependían exclusivamente de la dieta (Cole *et al.*, 2005).

En general, los individuos que solo se alimentaban de heces poseían un mayor número de bandas, lo cual reflejaba, *a priori*, que era más diversa. Hay que tener en cuenta que las heces formaban una matriz mucho más compleja que las bellotas, porque se componen de todo lo que haya ingerido el mamífero y podría contener trazas de las mismas bellotas o plantas. A pesar de la información que nos proporciona esta técnica también posee cierto sesgo, ya que puede dar lugar a múltiples secuencias asociadas a una misma banda, heterodúplex, etc. (Nelson *et al.*, 2013; Satokari *et al.*, 2001). En nuestro caso, en vez de estudiar cada una de las bandas nos dispusimos a

clonar el ADN extraído en cada uno de los intestinos para, posteriormente, secuenciar el gen *16S rARN* y obtener información de la diversidad bacteriana. El resultado fue un total de 374 especies de bacterias que pertenecían a los filos de las Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes y Actinobacteria, siendo al igual que en el caso anterior, mayoritario el de las Proteobacterias. Estos datos concuerdan con los obtenidos por otros autores (Huang *et al.*, 2012; Mabhegedhe, 2012; Kaltenpoth, 2009; Seipke *et al.*, 2012; Pessione, 2012) que indican que tal distribución podría explicarse por la capacidad de adaptación de las bacterias a las condiciones extremas existentes en el intestino (Garrity *et al.*, 2003). Las bacterias pertenecientes al filo Firmicutes, como ya se indicó, poseen una importante función en la degradación de azúcares y formación de ácidos lácticos que pueden ser importantes en la preservación del pH del medio donde habitan y podrían ser usados como defensa en la colonización de otras bacterias.

Sin embargo, atendiendo a los datos obtenidos por las técnicas anteriores se esperaba una mayor diversidad en el caso de las escarabajos alimentados con heces (Rodríguez-Estevez *et al.*, 2008), y más bacterias asociadas al metabolismo de los ácidos grasos. Esta expectativa la justificamos porque si se comparan a nivel físico las dos poblaciones se observa una gran diferencia entre unos y otros individuos. Los escarabajos que se alimentan de bellotas poseen un cuerpo graso muy desarrollado en comparación con aquellos que solo se alimentan de heces (Verdú *et al.*, 2009), y esta característica podría estar asociada a un reservorio de energía en forma de ácidos grasos. Otro hecho curioso, y que coincide con la función detoxificante, es que encontramos bacterias que pertenecían al género *Arthrobacter*, responsables de la degradación de ácidos aromáticos (Chen *et al.*, 1998). Este dato concuerda con lo citado anteriormente, ya que estas bacterias podrían ser capaces de degradar sustancias orgánicas como las derivadas del terpeno, que funciona de barrera defensiva de semillas como es el caso del pino. Mahowald (2009) estudió en ratones gnotobióticos la relación entre dos filos, que se encuentran presentes en *T. lusitanicus*, Firmicutes y Bacteroidetes. Las bacterias pertenecientes a ambos filos establecían una serie de relaciones de mutualismo y proporcionaban un beneficio mutuo, ya que el genoma de las bacterias del filo Bacteroidetes posee un amplio número de genes que

codifican para enzimas que degradan los glicanos, que no poseen las bacterias del filo Firmicutes. Este hecho hace referencia a la regulación de los *loci* de genes que modulan la utilización de polisacáridos. Esta característica da lugar al ahorro energético, refiriéndonos a la síntesis de nuevas enzimas y más cuando no se necesitan en exceso, por lo cual se adaptan unas especies a otras buscando el beneficio mutuo.

Para realizar un estudio robusto y poder determinar las relaciones filogenéticas con más certeza, nos decidimos a realizar la secuenciación en masa del gen *16S rARN*, con el fin de ampliar los estudios de biodiversidad bacteriana de la microbiota intestinal. La elección de la secuenciación en masa o pirosecuenciación 454 (Roche) por encima de otros sistemas, la realizamos en función de la rapidez y fiabilidad en la determinación de los diferentes niveles taxonómicos (Hong *et al.*, 2011). Los índices de diversidad y riqueza (Chao1 y ShannonH) no coincidieron con las expectativas que teníamos marcadas y que fueron obtenidas por otros métodos, es decir, que aquellos individuos que estaban alimentados con bellotas tenían más diversidad, pero sí coincidieron en que aquellos que estaban alimentados con heces poseían mayor abundancia. Aún así, se observamos la existencia de cierta heterogeneidad entre los individuos de cada una de las dietas. Este estudio también corroboró que existen bacterias que se comparten en ambas poblaciones y que dan lugar a un *core* o núcleo, en este caso Actinobacteria (*Marmoricola* y bacterias Actinomicetales) y Gammaproteobacteria (*Enterobacter*, *Hafnia*, *Kluyvera*, *Raoultella* y *Serratia*).

Martínez-Falcón (2011) demostró que las larvas de insectos que se alimentan de un cactus específico, poseen bacterias constantes, por lo que en ambas dietas es presumible que existan bacterias concretas que degraden nutrientes esenciales. Ben-Yoseph (2008) observó que en el caso de la mosca de la fruta este núcleo se adquiría por transmisión vertical de madre a la descendencia. Ello hace pensar en la posibilidad de que existan en *T. lusitanicus* una serie de bacterias-simbiontes asociadas a su intestino. También podríamos hablar de tendencia, como indica Roeselers (2011), cuyos estudios concluyen que los miembros de una misma especie poseen la tendencia a tener una composición taxonómica similar a nivel de filo o clase. Dentro de

la diversidad de cada dieta, se observaron filotipos que eran exclusivas de cada uno de los individuos.

La abundancia relativa de las muestras determinó que existían 334 filotipos, este tipo de datos está sesgado ya que depende (1) del umbral que determine la aplicación del RDPII del número de nucleótidos de las secuencias obtenidas y (2) del punto de corte de abundancia relativa que se determinó, y que en el caso de este trabajo de investigación fue del 1%. En resumen, se concretaron 8 géneros que eran compartidos entre todos los individuos estudiados e independientemente de la dieta (*Marmoricola*, *Bacilli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Hafnia*, *Kluyvera*, *Raoultella*, *Serratia*). El género mayoritario fue *Raoultella* (43.75%). Estos resultados son similares a los que son obtenidos en el Proyecto Microbioma Humano, por lo que se puede considerar que son comunes en el intestino de todos los seres vivos (Turnbaugh *et al.*, 2009; Sorek *et al.*, 2009).

Dentro de los géneros que son específicos de dieta podemos indicar que existen bacterias que pueden jugar un papel fundamental en la vida del escarabajo. Como es el caso de Prevotellaceae que se relaciona con la biosíntesis de metabolitos secundarios, transporte y catabolismo y de Ruminococcaceae que juega un papel importante en la defensa contra la entrada de patógenos. En el caso de otros escarabajos del estiércol como *Onthophagus taurus*, el filo mayoritario es el de las Proteobacterias al igual que sucede en *T. lusitanicus*, por lo que estos datos apoyan la existencia de este filo de forma mayoritaria (Estes *et al.*, 2013).

Es importante remarcar que podría existir cierto sesgo en los datos obtenidos, ya que dentro del sustrato vegetal en el que habitan los escarabajos, podrían existir microorganismos que cedan al medio sustancias que pudieran ser tóxicas para parte de la microbiota intestinal del escarabajo, por lo que todos los datos tanto de diversidad y abundancia se tendrían que tomar como relativas. Un ejemplo que puede apoyar esta hipótesis son los hongos y levaduras que alteran la composición de la microbiota, con la producción de metabolitos tóxicos (Kinoshita *et al.*, 2000).

La divergencia de las especies de bacterias obtenidas con las consideradas normales en los tractos gastrointestinales de los animales (que pertenecen a Clostridia y a la familia de las Succinivibrionaceae) se podría deber a que éstas son anaerobias estrictos y sólo encuentran su nicho en el intestino de los mamíferos, especialmente de los rumiantes.

La dieta basada en bellotas es extremadamente rica en lignina y pobre en aminoácidos. La lignina debe de ser digerida por una maquinaria de enzimas que no se encuentra presente en el escarabajo (Rodríguez-Estévez *et al.*, 2008). Scully (2013) explicó que una de esas enzimas era la lacasa que se encuentra endógenamente en la microbiota de las termitas y que modifica los fenoles de la lignina. También se puede justificar, de esta manera, la presencia de hongos como el *Fusarium* spp. que es capaz de sintetizar este tipo de enzimas por sí mismo (Pauchet *et al.*, 2010; Aw *et al.*, 2010; Keeling *et al.*, 2010). La microbiota intestinal constante de *T. lusitanicus* podría encontrarse relacionada con la modificación e incremento de la producción de enzimas asociadas a la degradación de la lignina, a través del propio escarabajo o bien con la producción basal de las enzimas por parte de las bacterias. A la pobreza de los nutrientes existentes en la dieta se le añade el factor limitante de la incapacidad de sintetizar aminoácidos que son vitales, como es la glutamina y la asparagina, por lo cual su degradación debe asociarse a bacterias que los sintetizan.

Apoyando la hipótesis de Mahowald (2013) en ratones gnotobióticos y por medio de estudios de transcriptómica, se ha demostrado que las bacterias que forman parte de la microbiota intestinal del escarabajo poseen acción de regulación en la expresión de genes de otras bacterias (Scully *et al.*, 2013; Pauchet *et al.*, 2010; Aw *et al.*, 2010; Keeling *et al.*, 2010). Esto se debería a la síntesis de enzimas necesarias para digestión de la lignina y otras moléculas que son de difícil digestibilidad, como es la pared celular vegetal y las enzimas de detoxificación, cuyas rutas metabólicas se encuentran constitutivamente bloqueadas. Este sería el caso de la ya mencionada degradación de esteroides y ácidos aromáticos, con la presencia de *Arthrobacter* spp. que puede utilizar estos compuestos.

El estudio del gen *16S rARN* mostró una gran diversidad a nivel de individuo y pretendimos establecer a nivel ecológico las relaciones existentes entre ellos, por lo que se desarrolló un Análisis de Correspondencia (DCA). La distribución de los escarabajos, usados en el muestreo, demostró que se encontraban interconectados pero no pudieron separarse dos clúster diferentes, como se habría previsto, atendiendo a los datos obtenidos por técnicas tradicionales o de clonaje. Se observa una mayor homogeneidad en el caso de los escarabajos que se alimentaban con bellotas y una mayor heterogeneidad en los alimentados con heces, datos que apoyan lo obtenido por los índices Chao1 y Shannon H y que se pueden entender, como se ha indicado otras veces, por la complejidad de la composición de las heces, aunque no explica la variación interindividual existente.

En resumen, la mayoría de las bacterias pertenecen a las Gammaproteobacterias y van desde aquellas que son anaerobias estrictas a aquellas que son sulforreductoras. Por norma general, es bastante heterogénea la diversidad existiendo un *core* o núcleo constante y otras que son fluctuantes. Podemos concluir que la diversidad en el caso de la población de heces es menor, respecto al número de especies encontradas, pero no al número de géneros, que en la población de bellotas. Lo cual contradecía lo hallado por medio de la secuenciación y la DGGE y no era lo esperado. La justificación es que (1) en este estudio se usaron otras muestras y que, además, la sensibilidad de la técnica usada (pirosecuenciación) es mayor que la usada anteriormente, tanto en el caso de las bacterias cultivables como en el método de la creación de una genoteca (método Sanger). Además, (2) la microbiota de la población alimentada con heces es menos diversa, por los micronutrientes. La dieta basada en heces es pobre en nutrientes, ya que carece de aminoácidos esenciales para el metabolismo de un insecto como son el triptófano, metionina, fenilalanina, histidina y arginina y, el 86% se compone de celulosa (Fraenkel, 1954).

En el futuro, un estudio más profundo de la microbiota intestinal determinaría cuál es la población endosimbionte, ya que entre los insectos existen relaciones muy estrechas con grupos taxonómicos concretos, que implican millones de años de asociación, y con ello, de evolución. Las bacterias endosimbiontes se encuentran en

células concretas que se denominan bacteriocitos y los casos más estudiados son los afidios (Munson *et al.*, 1991), moscas tsetse (ya comentada anteriormente) (Chen *et al.*, 1999), cucarachas (Lo *et al.*, 2003), moscas blancas (Thao *et al.*, 2004), psilidos (Thao *et al.*, 2002), cochinillas (Baumann *et al.*, 2002], escarabajos de la harina (Lefevre *et al.*, 2004), y hormigas (Schröder *et al.*, 1996; Degnan *et al.*, 2009). Además, concluimos que no sólo la microbiota presente si no la microbiota activa, en términos de diversidad y abundancia, está implicada en la supervivencia de *T. lusitanicus*. El estudio de los genes microbianos que se encuentran en el escarabajo esclarecerían los cambios morfológicos y fisiológicos. En la introducción se puede observar que no sólo hay cambios físicos, sino también de composición de la hemolinfa. Una de las variaciones quizás más importantes es la mayor concentración de la proteína AFP (*antifreeze protein*), por lo que puede sugerirse que existe una relación directa con la transcripción, dando lugar a una expresión génica regulada. Es decir, podrían existir proteínas microbianas asociadas (bien sean enzimas o factores de expresión) que dieran lugar a unos mayores niveles de transcripción del gen que codifica esta proteína (observaciones personales).

3. Funcionalidad de la microbiota intestinal de *T. lusitanicus*.

Una vez analizada la microbiota intestinal de un organismo es importante conocer cómo influye en el ecosistema, para poder determinar con exactitud su papel en el ecosistema. Aquello que se puede determinar fácilmente es la capacidad que tiene para dispersar los frutos de *Quercus* spp. pero existen otros aspectos importantes como el tipo de interacciones con el resto de seres vivos o la funcionalidad que podrían tener los microorganismos, tanto a nivel del ecosistema como de la utilidad y empleo por parte del ser humano en acciones beneficiosas.

Dentro de la microbiota intestinal podemos encontrar funciones concretas que consiguen subrayar la importancia de su estudio, por lo que podemos destacar:

1.- Funciones relacionadas con la Sanidad Pública o Sanidad Animal.

Los artrópodos pueden ser portadores de bacterias patógenas o bacterias que portan genes de resistencia a antibióticos. Dentro de las bacterias que se pudieron aislar del intestino de *T. lusitanicus* se observó que existían bacterias que tenían interés tanto en la medicina animal, como en la humana.

2.- *Biorremediación o detoxificación* de componentes tóxicos.

El metabolismo de las bacterias encontradas da lugar a la producción de compuestos orgánicos o inorgánicos que son menos lesivos o inocuos para el medio ambiente.

3.- *Ciclo del nitrógeno*.

El nitrógeno es un elemento esencial para los seres vivos ya que forman parte de las proteínas y de los ácidos nucleicos. La principal fuente de nitrógeno es el N_2 atmosférico, pero no es utilizable por la mayoría de los seres vivos, ya que sólo determinadas bacterias tienen la capacidad de utilizarlo.

4.- *Uso de los nutrientes que conforman la dieta*.

Dentro de los componentes de los alimentos existen algunos que no se pueden aprovechar, a no ser que se tenga de modo innato la maquinaria metabólica necesaria, es decir, las enzimas catabólicas que degraden esa molécula específica o bien se tengan bacterias simbióticas con esas enzimas. Si no fuera por esta característica, las dietas, aún siendo ricas en nutrientes, no nutrirían a quien ingiere estos alimentos.

5.- *Otros usos de interés para el ser humano*.

Los metabolitos secundarios de la transformación de la materia orgánica, en ocasiones puede dar lugar a metabolitos secundarios originados por las bacterias, teniendo un uso importante para el ser humano.

3.1. Función de la microbiota intestinal de *T. lusitanicus* en Sanidad Animal y Salud Pública.

Tan sólo en 2011, según datos de la Organización Mundial de la Salud, se diagnosticaron 174 millones de personas infectadas y murieron 655.000 millones de

muertes de enfermedades infecciosas como el dengue cuyo vector es un artrópodo (*Aedes aegypti*). Además también hay que señalar que son una plaga en la agricultura dañando la mayoría de plantas de grano. En torno a la mitad de la producción de este tipo de plantas se pierde debido a la actividad de los insectos, bien como herbívoros o bien por ser vectores de patógenos de plantas (Oerke, 2006). Por lo tanto, el estudio de la microbiota intestinal de los insectos puede dar lugar a encontrar bacterias que podrían ser útiles para poder evitar estos acontecimientos.

Los coleópteros son seres vivos de vida libre podrían servir como vector de propagación de factores de resistencia a antibióticos tanto en animales salvajes como aquellos que se encontraban estabulados. En la microbiota intestinal de *T. lusitanicus*, encontramos 10 aislados que pertenecían a los géneros *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Escherichia*, *Pseudomonas*, y *Enterobacter* (Huycke *et al.*, 1998; Choi *et al.*, 2004; Vendrell *et al.*, 2006; Tejedor *et al.*, 2011; Chan *et al.*, 2011; Capdevila *et al.*, 1998), con interés en Salud Pública y Sanidad Animal. Nuestros resultados tras la realización de los test de sensibilidad de los aislados a diferentes antibióticos (pertenecientes a diferentes familias) indicaron que algunos son resistentes por lo cual podrían dar lugar a la propagación de (1) agentes patógenos entre el medio ambiente, animales y humanos; y (2) bacterias que poseían genes de resistencia a antibióticos que pudieran dar lugar a la expansión de tal resistencia por los mecanismos desarrollados en la Introducción.

De los aislados el que tiene más interés es el de *Escherichia coli* encontrado. Cabe destacar la cepa O26:H11 que es una de las bacterias más estudiadas, debido a que habita en el intestino de los mamíferos y allí es donde posee una función necesaria para la absorción de una serie importante de nutrientes, pero también posee una actividad enterohemorrágica, puesto que la mayoría posee un fago que lleva el gen de la toxina verotoxigénica causante de la ya nombrada actividad enterohemorrágica y que actúa a nivel de colon. Cabe destacar que también se encontró por primera vez en la microbiota intestinal de un escarabajo la cepa O26:H11. En el caso de nuestro escarabajo, encontramos la que se denomina O157:H7, que ya fue descrita en el intestino de otro escarabajo coprófago, *Catharsius molossus* (Xu *et al.* 2003). En este

caso esta cepa es patógena siendo responsable, entre otras cosas, del síndrome hemolítico-urémico, por lo cual de gran importancia en la clínica (Croxen *et al.*, 2013). El uso desproporcionado de antibióticos tanto en la clínica (animal y humana) como a nivel de producción animal puede resultar en la diseminación de resistencias en el medio. Estas bacterias traban relaciones de simbiosis con otros organismos por lo cual se convierten en reservorio de resistencias y puede ser transferido a otros microorganismos (Salysers *et al.*, 2004; Stuart y Marshall, 2004). Así, consideramos que *T. lusitanicus* puede ejercer su papel de transmisor de las resistencias ya que posee una vida libre a lo largo de su hábitat. Hay que tener en cuenta que el biotopo al cual pertenecen es predominantemente rural por lo cual está en contacto directo con animales de producción y con animales salvajes (apreciaciones propias) y debido al uso como promotores de crecimiento ha existido una gran adaptación a tal presión por lo cual es normal pensar que se puedan encontrar cepas con resistencias a los antibióticos que son más usados.

El proceso de transmisión de resistencias se ha observado entre enterobacterias de la microbiota intestinal humana según los estudios de Viganroli *et al.* (2011). La firme candidata a la transferencia es *Enterococcus durans* y que se encuentra muy distribuida en la microbiota de insectos y animales de granja. Otros autores como Stock y Wiedemann (2002) estudiaron la sensibilidad a antibióticos del género *Enterobacter* dando como resultado que la mayoría eran sensible a un amplio rango de éstos. Estos investigadores propusieron la hipótesis de que las bacterias de diferente origen en contacto podrían intercambiar genes facilitando la dispersión y evolución de la resistencia. Probablemente este fuera un proceso de transmisión horizontal guiado por plásmidos que llevaban genes de resistencia (Baquero *et al.*, 2008).

Tras el estudio de la microbiota cultivable del intestino del escarabajo se llegó a la conclusión de que existían bacterias que son patógenas, por lo cual se puede considerar que es un vector potencial de las enfermedades infecciosas. Sin embargo, no necesariamente tiene que hacer estado implicado de forma efectiva y aún no se ha encontrado en la literatura ningún caso de escarabajos del estiércol responsables de brotes de enfermedades como sí sucede con otros insectos como mosquitos, pulgas,

entre otros (Mackereth *et al.*, 2013), aunque sí en la transmisión de nematodos a monos tras el consumo de escarabajos del estiércol (Jessee *et al.*, 1970; Machida *et al.*, 1978).

3.1.1. Otras bacterias patógenas de la microbiota intestinal de *T. lusitanicus*

Además de las bacterias comentadas anteriormente, encontramos en la microbiota intestinal de *T. lusitanicus* bacterias con diferentes funciones relacionadas con la Sanidad Animal y Salud Pública y que son dignas de mención en la discusión para mostrar la singularidad de las bacterias que colonizan el intestino del escarabajo.

Budvicia aquatica, dentro de la especie hay cepas que sintetizan agentes parecidos a bacteriocinas denominadas como acuaticinas, que van secretando al medio (Smarda *et al.*, 1987). Es una bacteria cuyo medio es el acuático y no se ha asociado con heces de animales de medio terrestre (Skrodenyte-Arbaciauskiene *et al.*, 2006). Se ha conocido un caso de infección en una mujer de 85 años tras el huracán Katrina (Corbin *et al.*, 2007).

Hafnia alvei, es una especie que se considera entérica. A veces, se comporta como patógeno oportunista y causa enfermedades nosocomiales, incluyendo gastroenteritis, bacteremia y neumonía, entre otras. Además, se conoce que produce la degradación de los aminoácidos de la carne dando aminas biogénicas.

Neisseria gonorrhoeae (*Gonococcus*) es el agente etiológico de la gonorrea, la segunda enfermedad de transmisión sexual en cuanto a frecuencia se trata. *N. meningitidis* (*Meningococcus*) es una de las principales causantes de la meningitis infantil en los países anglosajones (Kellogg *et al.*, 1963). Produce una alta mortalidad entre los niños y aquellos que sobreviven suelen tener grandes secuelas neurológicas. En cambio otras bacterias del género no son patógenas como son *N. sicca*, *N. flava*, *N. subflava*, *N. perflava* y *N. lactamicus* que forman parte de la microbiota normal de las vías respiratorias altas y de la vagina de las mujeres sanas (Knapp *et al.*, 1988). Esta bacteria se encuentra representada en más artrópodos como ya puso de manifiesto

O'Neill *et al.* (1992) en el estudio filogenético de la microbiota de *Wolbachia pipientis* y *W. persica*.

Providencia alcalifaciens, es un patógeno que fue aislado por primera vez por Albert *et al.* (1995) y Mathan *et al.* (1993) es un patógeno intracelular que penetra por las células epiteliales de dos maneras distintas: (1) por endocitosis asociada a la polimerización del citoesqueleto; y (2) por la ruptura de las uniones estrechas. Albert *et al.* demostraron que invaden células HEp-2 y que causaba diarrea en los conejos infectados. Ambos autores demostraron que no hay evidencia de la presencia de enterotoxinas o citotoxinas, que en principio se pensaron como responsables de la patogenia de esta especie. Es parte de la microbiota intestinal normal de escarabajos como es el *Orthophagus taurus* (Estes *et al.*, 2013).

Sanguibacter inulinus, fue aislada por primera vez en sangre de vacas sanas (Pascual *et al.*, 1996) Se usa para el biocontrol de patógenos como *Bacillus amyloliquefaciens*, *Brevibacterium otitidis*, *Candida* y *Wicherhamiella incommunis domercqiae*. Además, se ha constatado que conoce actividad nematocida y que controla la población de nematodos como *Meloidgyne incognita* (Lobna *et al.*, 2010).

Además de las bacterias destacadas anteriormente, en el futuro se podría estudiar el filo de las Actinobacterias, debido a que son capaces de degradar multitud de metabolitos secundarios y de sintetizar moléculas con actividad antibiótica (Kaltenpoth, 2009; Seipke *et al.*, 2012). Pensamos que el fin de hacer esto se debe a que protege de la entrada de otras bacterias que podrían ser patógenas, por lo cual se podría pensar como una barrera más dentro de la inmunología de *T. lusitanicus*.

3.2. Función en la biorremediación de la microbiota intestinal de *T. lusitanicus*.

La biorremediación de los sitios altamente contaminados con sustancias químicas es un reto importante, ya que la mayoría de los organismos no pueden tolerar altas concentraciones de componentes tóxicos.

Dentro de las bacterias encontradas en *T. lusitanicus* observamos géneros y especies que no sólo poseen cierta tolerancia a las sustancias tóxicas contaminantes, si no que algunas podrían tener una función en la descontaminación o biorremediación de los distintos medios. Un ejemplo de compuestos orgánicos tóxicos son los monoterpenos, ácidos diterpénicos y fenólicos que componen sustancias defensivas del epicarpio de la bellota. Dentro de la microbiota intestinal de *T. luitanicus* existen bacterias cuyo uso puede ser desde pesticida o bien pueden ser usadas en procesos de biorremediación degradando pesticidas (Christou *et al.*, 2006; Sanahuja *et al.*, 2011; Kikuchi *et al.*, 2012). Por ello, en el futuro se determinarán las funciones que podrían tener en términos antrópicos las bacterias del intestino ya que los usos a nivel práctico y biotecnológico pueden ser muchos. Además, de sustancias orgánicas tóxicas también se encuentran bacterias envueltas en la detoxificación de suelos contaminados por metales pesados como es el género *Bacillus sp.* también se puede encontrar presente en artrópodos de la clase Diplopoda como *Glomeris hexasticha* (Szábo *et al.*, 1987).

Con todo lo expuesto anteriormente, quisiéramos destacar las siguientes especies, ya que algunas de ellas nunca han sido descritas formando parte de la microbiota intestinal de ningún escarabajo:

Achromobacter xylosoxidans, posee una importante función en la biorremediación de TBP (2,4,6-tribromofenol) en acuíferos contaminados. Por lo cual, puede crecer en medios ricos en TBP que es una sustancia altamente tóxica y, además, usa esta molécula como única fuente de carbono (Ahmed *et al.*, 1973). Arias-Cordero *et al.* (2012) pusieron de manifiesto la relación de este género en otro escarabajos de la especie *Melolontha hippocastani*, y sus diferentes etapas dentro del ciclo vital, con el género *Achromobacter* siendo bastante frecuente su detección en individuos adultos.

Alcaligenes faecalis se encuentra comúnmente en el suelo, agua y en los ambientes asociados a humanos. Los cultivos de esta bacteria pueden sobrevivir a concentraciones de arsénico mayores de 10 g/L. La tolerancia se debe a la oxidación enzimática de la arsenita (As) a arseniato, que es menos tóxico. Tal reacción constituye para la bacteria una captación de energía debido a las reacciones químicas de tipo re-

dox. Por esto, se sugiere que ayuda a la detoxificación del suelo contaminado por arsénico (Ellis *et al.*, 2001). Además, se ha podido encontrar formando parte de la microbiota intestinal de otros escarabajos como *Dendroctonus rufipennis* y *Dendroctonus ponderosae* (Adams *et al.*, 2009).

Arthrobacter protophormiae, estudios indican que podría usar como fuente de carbono y energía sustancias orgánicas aromáticas (Jain *et al.*, 1994). La adaptación de esta bacteria a altas concentraciones de estos componentes hace que use el p-nitrofenol (PNP) y el 4-nitrocatecol (NCT) como fuentes de carbono, nitrógeno y energía (Chauhan, *et al.* 2000). La degradación de PNP y NCT tiene lugar en las rutas metabólicas oxidativas de la bacteria.

Bacillus subtilis, posee un papel dentro de la biorremediación debido a la síntesis de un polímero extracelular (EPS, exopolisacáridos) que absorbe cadmio. Estudios indican que cuanto mayor sea la concentración mayor es la síntesis de EPS dando lugar a la producción de un biofilm. Esta acción, también, sucede en medios ricos en minerales con metales pesados como el Cr (III) y que es una contaminación común de la industria de los tintes (Quintelas *et al.*, 2009). Esta especie de bacteria ya ha sido descrita previamente en escarabajos de la especie *Tribolium castaneum* (Altincicek *et al.*, 2013).

Brevundimonas terrae, es una especie descrita por Yoon *et al.* (2006), aislada de suelos alcalinos en Corea. Las bacterias de este género degradan el lactofén éter difenil, herbicida que se usa comúnmente para el control de malezas de hoja ancha. Se ha puesto de manifiesto que la cepa *Brevundimonas* sp.. LY-2 produce la biotransformación de lactofén en el suelo. Además se encuentran en diversos hábitat reseñando los metales ricos en uranio de minas de la India (Islam, *et al.*, 2011) o en glaciares del Tibet (Zhang *et al.*, 2010).

Leucobacter sp., se considera una especie capaz de degradar crudo y aceite debido a la presencia del gen *alkB*, que se traduce en una enzima con acción monooxigenasa. Algunas cepas de *Leucobacter* se aislaron de suelos contaminados con

cromato, por lo que se demostró que era tolerantes a este metal pesado y que, además, eran capaces de reducir Cr (VI) por medio de unas reductasas endógenas. Por ello, pueden ser útiles para el desarrollo de una tecnología biorreductora del cromato (Wang *et al.*, 2010). Estudios recientes encuentran a este género dentro de la microbiota cultivable de otros artrópodos como son *Aedes albopictus* (Minard *et al.*, 2013), *Ostrinia nubilalis* (Secil *et al.*, 2012) y en el nemátodo *Caenorhabditis angaria* (Percudani, 2013).

Obesumbacterium proteus es una bacteria que se encuentra asociada a la industria cervecera, ya que se aísla con frecuencia en las superficies relacionadas con su producción (Priest *et al.*, 1973). Puede catalizar la formación de componentes nitrogenados durante la etapa de fermentación de la cerveza. Se conoce que compite con las levaduras cerveceras por los nutrientes, por lo que interfiere en la producción dando un producto alterado (respecto a sus características organolépticas y pH, que es distinto a 3.9, característico de las cervezas). Posee una fitasa, PhyA, por lo que se podría preveer su utilización en el campo de la biorremediación, ya que añadida la enzima en los piensos de animales de producción pueden evitar la contaminación de los suelos y aguas a través del estiércol (Zinn *et al.*, 2005). Esta bacteria ha sido descrita en dos especies de cucarachas, *Periplaneta americana* y *Blatta orientalis*, por Chaichanawongsaroj *et al.* (2004) aunque no se había descrito en el intestino de escarabajos hasta ahora (apreciación personal).

Pseudomonas putida, es una de las especies con mayor interés entre las bacterias del género de las *Pseudomonas*, ya que posee un gran potencial para colonizar las raíces de las plantas y formar biofilms; y que, además, tiene una función en la descontaminación del medio. Se ha puesto de manifiesto que degrada componentes aromáticos y xenobiótico como el tolueno. La capacidad que tiene de degradar las sustancias orgánicas hace que se centren los estudios a la degradación de hidrocarburos alifáticos, que se producen de la combustión del fuel, carbón, tabaco, y otras materias orgánicas siendo más que probable su uso en la biorremediación a gran escala. También se ha constatado su capacidad para poder colonizar superficies con alta concentración de metales, por lo que abre nuevas vías a la investigación, ya que

podrían ser usados como bioindicador en suelos altamente contaminados. Esta especie se ha encontrado en otros escarabajos como *Dendroctonus micans* (Yilmaz *et al.*, 2006) e incluso hay autores que quieren potenciar la existencia de esta bacteria para equiparar los escarabajos a biofermentadores de materia orgánica (Bugg *et al.*, 2011).

Pseudomonas stutzeri es una bacteria desnitrificante que podría ser usada en la biorremediación por la capacidad de degradar las sustancias orgánicas tetracloradas. Probablemente se encuentre relacionada con la degradación de otros productos tóxicos orgánicos como el fenantreno (McNally *et al.*, 1999). Además, se conoce que es un patógeno oportunista produciendo infecciones. Sasikala *et al.* (2012) quería aplicar un consorcio de *P. putida*, *Klebsiella sp.*, *P. stutzeri* y *P. aeruginosa* con el fin de descontaminar suelo agrarios de pesticidas para controlar plagas. Weber *et al.*, (1993) ya describieron la existencia de esta bacteria en el intestino de las larvas del escarabajos *Phoracantha semipunctata* y sugirieron la posible relación de la dieta de la larva y la existencia de dos alfa-amilasas de *P. stutzeri*, por lo que se sugiere la importancia de esta simbiosis bacteria/hospedador.

Ralstonia eutropha se encuentra, principalmente, en el suelo y agua. Tiene un alto potencial en la biorremediación de sustancias orgánicas tetracloradas. En escarabajos de la especie *Harpalus pensylvanicus* (Lundgren y Lehman, 2010) se aislaron especies relacionadas como *R. pietitii*. También se relaciona con el control de plagas de diferentes artrópodos (Ortíz-Hernández *et al.*, 2013).

Serratia sp. es un género ubicuo en la naturaleza y al que se reconocen 10 especies diferentes (Grimont y Grimont, 1992). Las especies de *Serratia* se aíslan del agua, suelo, animales, ser humano y de la superficie de las plantas. Tal género se asocia a la microbiota de otros artrópodos como *Rodnius prolixus* (Lowenberger *et al.*, 1999). *Serratia grimesii*, es una especie no patógena pero capaz de invadir células eucariotas debido a la presencia de una proteína hidrolítica, la grimesilina que es específica para la actina. Además posee actividad antifúngica en especial para el hongo *Fusarium sambucinum* que infecta a la patata. De normal se usan fungicidas como el tiabenzadól, y con el uso de *S. grimesii* se evita el uso de sustancias químicas nocivas.

Stenotrophomonas sp., es un género de bacterias que se encuentran en diversos medios pudiendo ser común en el suelo y que puede ser un patógeno para el ser humano. Pino y colaboradores (2011) crearon un consorcio sintético de bacterias dentro de las cuales se encontraba este género con el fin de degradar metil paratión y p-nitrofenol. Las bacterias usan esta molécula como fuente de carbono pudiendo ser degradado completamente en 120 horas. Por ello, podría ser usada para disminuir la toxicidad de la contaminación.

Debido a la gran cantidad de bacterias con función detoxificadora, en el futuro, queremos centrarnos en aquellas que son más interesantes para estudiar más a fondo las propiedades que poseen, tanto a nivel de contaminantes orgánicos como de metales pesados.

3.3. Función fijadora del nitrógeno de la microbiota intestinal de *T. lusitanicus*.

En la microbiota intestinal de *T. lusitanicus* encontramos bacterias que son de interés en el ciclo del nitrógeno. Esto se debe de subrayar, ya que como comentamos anteriormente, debe de ser fijado por bacterias y es de grandísima importancia en las macromoléculas más importantes.

Se analizaron en la microbiota intestinal de este escarabajo, géneros de bacterias que pertenecían a los filos de las Enterobacteriales y Proteobacterias y que estaban relacionadas con el ciclo. Las bacterias pertenecientes a géneros, dentro de las Enterobacteriales, como *Rahnella*, *Serratia*, y *Enterobacter*, que podrían contribuir a la fijación del nitrógeno como sucede en el *Dendroctonus* (Vasanthakumar *et al.*,2006; Morales-Jiménez *et al.*,2012) y en la mosca de la fruta *Ceratitis capitata* (Behar *et al.*,2008a). Esto es importante debido a que los alimentos que suele ingerir son bastante pobres en algunos de los aminoácidos por lo que deben de ayudarse de bacterias que posean genes asociados a algunas de las rutas de fijación de nitrógenos y síntesis de estas macromoléculas. Algunas cepas de bacterias pertenecientes al filo *Proteobacteria* asociadas al intestino de *T. lusitanicus* poseen un rol en la fijación del nitrógeno. Es el caso de *Rahnella aquatilis* que se encuentra también en el tracto

intestinal de larvas del escarabajo del pino *Dendroctonus frontalis* (Vasanthakumar *et al.* 2006) y *D. valens* (Morales-Jiménez *et al.* 2009) y en el intestino de los escarabajos cornudos adultos *Corymbia rubra*, *Massicus raddei* y *Mesosa hirsute* (Park *et al.*, 2007). Esta bacteria es conocida por la fijación de nitrógeno (Behar *et al.* 2005; Vasanthakumar *et al.*, 2006) y en la degradación de los compuestos orgánicos sintetizados por las coníferas para su defensa (por ejemplo: monoterpenos, ácido diterpénico, y fenoles) (Cantos *et al.*, 2003). En el caso de las bacterias aisladas pertenecientes a las Betaproteobacteria podrían estar relacionadas con el ciclo del nitrógeno. Se han descrito que dentro del orden de las Burkholderiales donde encontramos a *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Cupriavidus*, y *Comamonas*, se relacionan con procesos de desnitrificación (Ishii *et al.*, 2009).

3.4. Uso de los nutrientes que conforman la dieta.

Unos de los nutrientes de predilección de tales bacterias son los hidratos de carbono, en especial la sacarosa por lo cual poseen enzimas que la degradan. Siendo de gran importancia la actividad celulolítica de algunas de estas bacterias que pertenecen a las Enterobacteriales y que se encuentran frecuentemente en el intestino de algunas larvas de escarabajo (Huang *et al.*, 2013; Mabhegedhe, 2012). Para *T. lusitanicus* es de vital importancia ya que para poder acceder al fruto de la bellota primera ha de ser capaz de poder romper el epicarpio que están lignificado, por lo que acción de bacterias que ayuden a tal efecto es necesario. Además, la dieta rica en celulosa incrementa la presencia de este tipo de bacterias, facilitando el crecimiento de *Clostridium sp.*, que es predominante en la microbiota humana y de ratón (Turnbaugh *et al.*, 2006; Ley *et al.*, 2005).

Enterococcus saccharolyticus, es una especie que hidroliza la celobiosa y produce biohidrógeno. Esto es importante para la degradación de compuestos orgánicos derivados de plantas. No lo hace sola, sino que tal degradación se ve relacionada con un consorcio formados por *Clostridium butyricum* (Adav *et al.*, 2009). Esta especie sólo se ha descrito previamente en la microbiota intestinal de un lepidóptero, *Agrotis*

segetum Schiff en donde destaca su actividad insecticida y, por lo tanto, de control de plagas (Sevim *et al.*, 2009).

Serratia marcescens y *Hafnia alvei* son productoras de quitinasas (Whitaker *et al.* 2004; Ruiz-Sánchez *et al.*, 2005), lo cual es necesario para digerir los hongos ingeridos por *T. lusitanicus*. En este mismo sentido, algunas cepas cercanas a *Sanguibacter* spp. se han identificado como productoras de quitina. En el caso de *T. lusitanicus*, *S. inulinus* en asociación con *S. marcescens* y *H. alvei*. *H. alvei* podrían dar lugar a la degradación de tal compuesto como sucede en el caso de otros escarabajos como *Anisodactylus sanctaecrucis* y *Harpalus pensylvanicus* (Lundgren *et al.*, 2007).

3.5. Otros usos de interés para el ser humano.

Algunas de las bacterias que forman parte de la microbiota intestinal de *T. lusitanicus* podrían tener un uso industrial, ya que por medio de compuestos orgánicos fáciles de obtener y de bajo coste se podría dar lugar a la síntesis de materiales de amplio uso por el ser humano. Además, otros usos pueden estar ligados a la industria alimentaria, ya que el ser humano desde siempre bacterias para transformar los alimentos. También, encontramos en la microbiota intestinal de *T. lusitanicus* bacterias que no están directamente incluidas en la biorremediación pero cuyo uso podría dar lugar a una mejora cualitativa y cuantitativa del medio ambiente. Estas bacterias son capaces de sintetizar plásticos biodegradables y, en el futuro, podrían dar lugar a la sustitución de los poliestirenos; y otras podrían dar lugar a la síntesis de biocombustibles a partir de productos sencillos como la patata.

Desde finales del siglo XX se ha desarrollado mucho la industria de los combustibles buscando cada día nuevas alternativas para el uso del petróleo, que es un recurso limitado y que da lugar a la emanación de gases tóxicos y con grandes consecuencias para el medio ambiente. Por ello, la alternativa sostenible es la búsqueda de bacterias que por medio de algún recurso de tipo ilimitado den lugar a combustibles más limpios. En este aspecto, no sólo se buscan bacterias si no genes que

puedan ser insertados en otras bacterias dando lugar al desarrollo de la biología sintética y biotecnología (Ponce-Noyola *et al.*, 2013).

Destacamos las siguientes bacterias que son de gran interés por su posible aplicación:

Bacillus subtilis, en la acuicultura funciona de probiótico en conjunto con bacterias del ácido láctico (Aly *et al.*, 2008). Su acción en el cultivo de lenguado, tilapia y langostino es la de inmunoestimulante ayudando al crecimiento de los peces. Además de su función en la acuicultura, la cepa *Bacillus subtilis natto* se usa como starter en la cocina japonesa (Shih *et al.*, 2005).

Pectobacterium carotovorum una de las posibles aplicaciones es la producción de bioetanol a partir de la patata. De este modo se podría producir combustibles a partir de materia prima barata no contaminante (Afifi *et al.*, 2007). Este género fue anteriormente descrito en escarabajos de las especies *Corymbia rubra*, *Monochamus alternatus*, *Moechotypa diphyssys*, *Mesosa hirsute*, *Massicus raddei* y *Prionus insularis* formando parte de la microbiota intestinal de los especímenes adultos (Park *et al.*, 2007).

Ralstonia eutropha es un modelo para la producción de polihidroxialcanolatos (PHA) debido a la existencia de una enzima endógena llamada PHA-sintetasa que son poliésteres producidos por la fermentación de azúcares o grasas y que se usan como plásticos biodegradables (Antonio *et al.*, 2000).

CONCLUSIONES

Las conclusiones obtenidas en el este trabajo de investigación son las siguientes:

1. El estudio de las bacterias cultivables en medio aerobio y anaerobio determinó que existe una gran diversidad en la microbiota intestinal del escarabajo polífago *Thorectes lusitanicus*.
2. La microbiota intestinal de *Thorectes lusitanicus* varía acorde al tipo de dieta ingerida y la mayor diversidad corresponde a los escarabajos cuya dieta está constituida por heces de mamíferos.
3. La determinación de las especies de bacterias por medio de la secuenciación Sanger del gen *16S rARN* concluyó que existen géneros que son exclusivos de cada una de las dietas y que hay una microbiota intestinal que es constante denominada núcleo o *core*.
4. El uso de técnicas moleculares como la pirosecuenciación o secuenciación masiva, en comparación con las técnicas dependientes de cultivo, dieron resultados que difieren ligeramente y que se explican por el sesgo que supone la existencia de especies no cultivables y al modo de analizar la información recogida.
5. Mediante estudios metagenómicos, se ha comprobado que los escarabajos alimentados con heces poseen un mayor número de especies bacterianas en su microbiota intestinal, a pesar de tener un número limitado de géneros.
6. El empleo de técnicas moleculares de secuenciación masiva nos ha permitido determinar que el *core* o microbiota núcleo estaría formado por bacterias que podrían considerarse endosimbiontes, como sucedería en otros artrópodos.
7. Dentro de la microbiota intestinal de *T. lusitanicus* se encuentran bacterias que son patógenas de animales y del hombre, por lo tanto podría considerarse este

escarabajo como un vector potencial de enfermedades infecciosas y diseminador de resistencia a antibióticos.

8. Es la primera vez que se detecta *Escherichia coli* O26:H11 en el intestino de un coleóptero, fuera del intestino de un mamífero.
9. Las bacterias que se encuentran presentes en la microbiota intestinal de *T. lusitanicus* poseen funciones específicas que aseguran la supervivencia del escarabajo, siendo de gran importancia aquellas bacterias que ayudan a la degradación de componentes de la dieta, fijan el nitrógeno del medio, y aquellas que degradan sustancias tóxicas como son los derivados de ácidos aromáticos y terpenos.
10. Dentro de las funciones de la microbiota intestinal es de gran importancia su implicación en la biorremediación, por las propiedades detoxificantes de ciertas bacterias. Esta microbiota podría ser usada en el futuro para la limpieza de zonas contaminadas o incluso para la síntesis de compuestos biodegradables que no supongan ningún daño para el Medio Ambiente.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, A. S., Currie, C. R., Cardoza, Y. J., Klepzig, K. D. y Raffa, K. F. (2009) Effects of symbiotic bacteria and tree chemistry on the growth and reproduction of bark beetle fungal symbionts. *Can. J. For. Res.* 39, 1133–1147.
- Adav, S. S., Ravindran, A. y Sze, S.K. (2012) Quantitative proteomic analysis of lignocellulolytic enzymes by *Phanerochaete chrysosporium* on different lignocellulosic biomass. *J Proteomics*, 75, 1493–504.
- Afifi, M. M., El-Ghany T. M., A., Al Abboud Mohamed, A., Taha, T. M., Ghaleb, K. E. (2011) Biorefinery of Industrial Potato Wastes to ethanol by Solid State Fermentation. *Res. J. Agr. Biol. Sci.* 7, 126-134.
- Ahmad, A., Ghosh, A. y Zurek, L. (2011) Insects in confined swine operation large antibiotic resistant and potentially virulent enterococcal community. *BMC Microbiol.* 11, 23.
- Ahmed, M. y Focht, D. D., (1973) Oxidation of polychlorinated biphenyls by *Achromobacter* sp. *CB Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 10, 70-2.
- Akman, L., Yamashita, A., Watanabe, H., Oshima, K., Shiba, T., Hattori, M. y Aksoy S., (2002) Genome sequence of the endocellular obligate symbiont of tsetse flies, *Wigglesworthia glossinidia*. *Nat. Genet.* 32, 402–407.
- Aksoy, S. (1995) *Wigglesworthia* gen. nov. and *Wigglesworthia glossinidia* sp. nov., taxa consisting of the mycetocyte-associated, primary endosymbionts of tsetse flies. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45, 848–851.
- Alam, M. J. y Zurek, L.. (2004) Association of *Escherichia coli* O157:H7 with houseflies on a cattle farm. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 7578–7580.
- Albert, M. J., Ansaruzzaman, M. , Bhuiyan, N. A., Neogi, P. K. B. y Faruque, A. S. G. (1995) Characteristics of invasion of HEp-2 cells by *Providencia alcalifaciens*
- Alkindi, A. Y., Mahmoud, I. Y., Woller, M. J. y Plude, J.L.. (2006) Oviductal morphology in relation to hormonal levels in the snapping turtle, *Chelydra serpentina*. *Tissue Cell* 38, 19–33.
- Alonso, A., Rojo, F. y Martinez, J. L. (1999) Environmental and clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* show pathogenic and biodegradative properties irrespective of their origin. *Environ. Microbiol.* 1, 421–430.

- Altincicek, B., Elashry A., Guz, N., Grundler, F. M. W., Vilcinskas, A., y Dehne, H.-W. (2013) Next generation sequencing based transcriptome analysis of septic-injury responsive genes in the beetle *Tribolium castaneum*. PloS One 8, e52004.
- Andersson, A.F., Lindberg, M., Jakobsson, H., Backhed, F., Nyren, P., *et al.* (2008) Comparative analysis of human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. PloS One 3, e2836.
- Andert, J., Marten, A., Brandl, R. y Brune, A. (2010) Inter- and intra- specific comparison of the bacterial assemblages in the hind- gut of humivorous scarab beetle larvae (*Pachnoda* spp.) FEMS Microbiol. Ecol. 74, 439–449.
- Andresen, E. (2002) Dung beetles in a Central Amazonian rainforest and their ecological role as secondary seed dispersers. Ecol. Entomol. 3, 87–97.
- Angelakis, E., Armougom, F., Million, M. y Raoulst, D. (2012) The relationship between gut microbiota and weight gain in humans. Future Microbiol. 7, 91-109.
- Antonio, R.V., Steinbüchel, A., y Rehm, B.H.A. (2000) Analysis of in vivo substrate specificity of the PHA synthase from *Ralstonia eutropha*: formation of novel copolyesters in recombinant *Escherichia coli*. FEMS Microbiol. Lett. 182, 111–117
- Araki, J., Machida, M., Koyama, T., Kumada, M., Kawabata, M., Horii, Y., Imada, I., Honjo, S., Takasaka, M., Tiba, T. y Matsubayashi, K. (1977) The life-cycle of *Streptophagus* sp. Jap. J. Parasitol. Volume 26, pp 80.
- Arias, C. A y Murray B.E. (2009) Antibiotic-resistant bugs in the 21st century - A clinical super-challenge". N. Engl. J. Med. 360, 439–443.
- Aw, T., Schlauch, K., Keeling, Cl., Young, S., Bearfield, J.C. *et al.* (2010) Functional genomics of mountain pine beetle (*Dendroctonus ponderosae*) midguts and fat bodies. BMC Genom. 11, 215.
- Aylward, F.O., Burnum, K.E., Scott, J.J., Suen, G., Tringe, S.G., Adams, S.M., Barry K.W., *et al.* (2012) Metagenomic and metaproteomic insights into bacterial communities in leaf-cutter ant fungus gardens. ISME J. 6, 1688–1701.
- Backhed, F., Ding, H., Wang, T., Hooper, L. V., Koh, G. Y., Nagy A., Semenkovich, C. F., y Gordon, J. I. (2004) The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 15718–15723.

- Backhed, F., Manchester, J. K., Semenkovich, C. F. y Gordon, J. I. (2007) Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 104, 979–984.
- Baker, G.C., Smith, J.J. y Cowan, D.A. (2003) Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J. Microbiol. Methods* 55, 541–555.
- Bandi, C., Sironi, M., Damiani, G., Magrassi, L., Nalepa, C. A. *et al.* (1995) The establishment of intracellular symbiosis in an ancestor of cockroaches and termites. *Proc. Biol. Sci.* 259, 293–299.
- Baquero F., Martínez J-L. y Cantón R. (2008) Antibiotics and antibiotic resistance in water environments. *Curr. Op. Biotech.* 19, 260-265.
- Barbosa, T. M. y Levy, S. B. (2000) The impact of antibiotic use on resistance development and persistence. *Drug Resist. Updates* 3, 303–311.
- Basset, Y., Novotny V., Miller, S.E. y Kitching, R.L. (eds) (2003) *Arthropods of Tropical Forests. Spatio-temporal Dynamics and Resource Use in the Canopy*. Cambridge University Press.
- Baumann, L., Thao, M.L., Hess, J.M., Johnson, M.W. y Baumann, P. (2002) The genetic properties of the primary endosymbionts of mealybugs differ from those of other endosymbionts of plant sap-sucking insects. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 3198–3205.
- Beard, C.B., Mason, P.W., Aksoy S. *et al.* (1992) Transformation of an insect symbiont and expression of a foreign gene in the Chagas' disease vector *Rhodnius prolixus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 46, 195–200.
- Behar, A., Yuval, B. y Jurkevitch, E. (2008a) Gut bacterial communities in the Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*) and their impact on host longevity. *J. Insect Physiol.* 54, 1377–1383.
- Behar, A., Jurkevitch, E. y Yubal, B. (2008b) Bringing back the fruit into fruit fly–bacteria interactions. *Mol. Ecol.* 17, 1375–1386.
- Ben Ami, E., Yural, B. y Jurkevitch, E. (2010) Manipulation of the microbiota of mass-reared Mediterranean fruit flies *Ceratitis capitata* (Diptera: Tephritidae) improves sterile male sexual performance. *ISME J.* 4, 28–37.

- Ben-Yosef, M., Jurkevitch, E., Yuval, B. (2008) Effect of bacteria on nutritional status and reproductive success of the Mediterranean fruit fly *Ceratitis capitata*. *Physiol. Entomol.* 33, 145–154.
- Bencina, D., Tadina y T., Dorrer, D. (1988) Natural infection of ducks with *Mycoplasma synoviae* and *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma* egg transmission. *Avian Pathol.* 17, 441–449.
- Benson, A.K., Kelly S.A., Legge, R., Ma, F., Low, S.J., Kim, J., Zhang, M., Oh, P.L., *et al.* (2010) Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107, 18933–18938.
- Benveniste, R. y Davies, J. (1973) Aminoglycoside antibiotic- inactivating enzymes in actinomycetes similar to those present in clinical isolates of antibiotic-resistant bacteria. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 70, 2276–2280.
- Bielaszewska, M., Mellmann, A., Bletz, S., Zhang, W., Köck, R., Kossow, A., *et al.* (2013) Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H11/H7: a new virulent clone emerges in Europe. *Clin. Infect. Dis.* 56, 1373–1381.
- Bonomo, R. A. y Szabo, D. (2006) Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin. Infect. Dis.* 43, S49–S56.
- Booijink, C.C., Boekhorst, J., Zoetendal, E.G., Smidt, H., Kleerebezem, M., *et al.* (2010) Metatranscriptome analysis of the human fecal microbiota reveals subject-specific expression profiles, with genes encoding proteins involved in carbohydrate metabolism being dominantly expressed. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 5533–5540.
- Bravo, J.A., Forsythe, P., Chew, M.V., Escaravage, E., Savignac, H.M., *et al.* (2011) Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 16050–16055.
- Breznak, J.A. (1982) Intestinal microbiota of termites and other *Xylophagous*. *Insects. Annu. Rev. Microbiol.* 36, 323–328.
- Broderick, N. A., Raffa, K. F., Goodman y R. M., Handelsman, J. (2004) Census of the bacterial community of the gypsy moth larval midgut by using culturing and culture-independent methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 293–300.

- Brown, L. L., Cox, W. T. y Levine, R. P. (1997) Evidence that the causal agent of bacterial cold-water disease *Flavobacterium psychrophilum* is transmitted within salmonid eggs. *Dis. Aquat. Org.* 29, 213–218.
- Brulc, J.M., Antonopoulos, D.A., Berg Miller, M.E., Wilson, M.K., Yannarell, C., Dinsdale, E.A. *et al.* (2009) Gene-centric metagenomics of the fiber-adherent bovine rumen microbiome reveals forage specific glycoside hydrolases. *PNAS* 106, 1948–1953.
- Brundtland, G. H. (2000) Overcoming antimicrobial resistance. Organización Mundial de la Salud
- Brune, A. y Friedrich, M. (2000) Microecology of the termite gut: structure and function on a microscale. *Curr. Opin. Microbiol.* 3, 263–269.
- Brussard, L. y Hijdra, H. (1986) Some effects of scarabs beetles in sandy soils of The Netherlands. *Geoderma* 37, 325–330.
- Bryan, B.A., Kandulu, J., Deere, D.A., White, M., Frizenschaf, J., y Crossman, N.D. (2009) Adaptive management for mitigating *Cryptosporidium* risk in source water: a case study in an agricultural catchment in South Australia. *J. Environ. Manage.* 90, 3122–3134.
- Bugg, T. D., Ahmad, M., Hardiman, E. M. y Singh, R. (2011) The emerging role for bacteria in lignin degradation and bio-product formation. *Curr. Opin. Biotechnol.* 22, 394–400.
- Campbell, B.C. (1989) On the role of microbial symbiotes in herbivorous insects. In Bernays, E. (ed.), *Insect-plant interactions*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 24.
- Cantos, E., Espín, J.C., López-Bote, C., de la Hoz, L. Ordóñez, J.A., *et al.* (2003) Phenolic compounds and fatty acids from acorns (*Quercus* spp.), the main dietary constituent of free-ranged Iberian pigs. *J. Agric. Food Chem.* 51, 6248–6255.
- Capdevila, J.A., Bisbe, V., Gasser, I., Zuazu, J., Olivé, T., *et al.* (1998) *Enterobacter amnigenus*. An unusual human pathogen. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 16, 364–366.
- Castagnola, E., Conte, M., Venzano, P., Garaventa, A., Viscoli, C., Barretta, M.A, *et al.* (1997) Broviac catheter-related bacteraemias due to unusual pathogens in children with cancer: case reports with literature review. *J. Infect. Dis.* 34, 215–218.

- Cazemier, A.E., Camp, H.J.M.O., Den, Hackstein, J.H.P., Vogels, G.D. (1997) Fibre Digestion in Arthropods. *Science* (80) 118, 101–109.
- Cazemier, A.E., Hackstein, J.H.P., Op den Camp, H.J.M., Rosenberg, J. y van der Drift, C. (1997) Bacteria in the intestinal tract of different species of arthropods. *Microb. Ecol.* 33, 189–197.
- Chaichanawongsaroj, N., Vanichayatanarak, K., Pipatkullachat, T., Polrojpanya, M. y Somkiatcharoen, S. (2004) Isolation of gram-negative bacteria from cockroaches trapped from urban environment. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 35, 681–684.
- Chan, D.F., Woo, P.C., Teng, J.L., Lau, S.K. y Leung, S.S. (2011) Primary infective spondylitis caused by *Lactococcus garvieae* and a review of human *L. garvieae* infections. *Infect.* 39, 259–264.
- Chan, M. (2011) Informe Mundial sobre el Paludismo. Organización Mundial de la Salud.
- Chao, A. (1984) Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scan. J. Stat.* 11, 256–270.
- Chao, A., Hwang, W-H, Chen, Y-C, Kuo, C-Y. (2000) Estimating the number of shared species in two communities. *Statistica Sinica* 10, 227–246.
- Chauhan, A., Chakraborti, A. K., y Jain, R. K. (2000) Plasmid-encoded degradation of p-nitrophenol and 4-nitrocatechol by *Arthrobacter protophormiae*. *Biochem. Bioph. Res. Com.* 270, 733–740.
- Chen, D.K. y Chae, C. (1996) Outbreak of diarrhea associated with *Enterococcus durans* in piglets. *J. Vet. Diag. Invest.* 8, 123–124.
- Chen, W. y Mulchandani, A. (1998) The use of live biocatalysts for pesticide detoxification. *Trends Biotechnol.* 16, 71–76.
- Chen, X.A., Li, S. y Aksoy S. (1999) Concordant evolution of a symbiont with its host species: molecular phylogeny of genus *Glossina* and its bacteriome-associated endosymbiont, *Wigglesworthia glossinidia*. *J. Mol. Evol.* 48, 49–58.
- Choi, S.H., Lee, S.O., Kim, T.H., Chung, J.W., Choo, E.J., Kwak, Y.G., Kim, M.N. *et al.* (2004) Clinical features and outcomes of bacteraemia caused by *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus gallinarum*: analysis of 56 cases. *Clin. Infect. Dis.* 38, 53–61.

- Chouaia, B., Rossi, P., Montagna, M., Ricci, I. y Crotti, E. (2012) Molecular evidence for multiple infections as revealed by typing of *Asaia* bacterial symbionts of four mosquito species. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 7444-7450.
- Christou, P., Capell, T., Kohli, A., Gatehouse, J.A. y Gatehouse, A.M.R. (2006) Recent developments and future prospects in insect pest control in transgenic crops. *Trends Plant. Sci.* 11, 302–308.
- Chu, F. F., Esworthy, R. S., Chu, P. G., Longmate, J. A., Huycke, M. M., *et al.* (2004) Bacteria-induced intestinal cancer in mice with disrupted Gpx1 and Gpx2 genes. *Cancer Res.* 64, 962–968.
- Chu, T.L., Szabo, I.M. y Szabo, I. (1987) Nocardioform gut actinomycetes of *Glomeris hexasticha* Brandt (Diplopoda) *J Biol. Fert. Soils* 3, 113-116
- Claesson, M. J., O’Sullivan, O., Wang, Q., Nikkilä, J., Marchesi, J. R., *et al.* (2009) Comparative analysis of pyrosequencing and a phylogenetic microarray for exploring microbial community structures in the human distal intestine. *PLoS One* 4, e6669.
- Clark, J. W. y Kambhampati, S. (2003) Phylogenetic analysis of *Blattabacterium*, endosymbiotic bacteria from the wood roach, *Cryptocercus* (Blattodea:Cryptocercidae), including a description of three new species. *Mol. Phylogenet. Evol.* 26, 82–88.
- Cole, J.R., Chai, B., Farris, R.J., Wang, Q., Kulam-Syed-Mohideen, A.S., McGarrell, D.M. *et al.*, (2005) The Ribosomal Database Project (RDP-II): sequences and tools for high-throughput *rRNA* analysis. *Nuc. Acid. Res.* 33, D294–296.
- Cole, J.R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., *et al.* (2009) The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for *rRNA* analysis. *Nuc. Ac. Res.* 37, D141–5.
- Colman, D.R., Toolson, E. C. y Takacs-Vesbach, C. D. (2012) Do diet and taxonomy influence insect gut bacterial communities?. *Mol. Ecol.* 21, 5124–5137.
- Comas, I., Moya, A., Azad, R. K., Lawrence, J. G. y Gonzalez-Candelas, F. (2006) The evolutionary origin of Xanthomonadales genomes and the nature of the horizontal gene transfer process. *Mol. Biol. Evol.* 23, 2049–2057.
- Corbin, A., Delatte, C., Besson, S. Guidry, A., Hoffmann III, A. H., Monier, P. y Nathaniel, R. (2007) *Budvicia aquatica* sepsis in an immunocompromised

- patient following exposure to the aftermath of Hurricane Katrina. *J. Med. Microbiol.* 56, 1124-1125.
- Cornwell, W. K., Cornelissen, J. H. C, Allison, S. D., Bauhus, J., Eggleton, P., Preson, C. M., *et al.* (2009) Plant traits and wood fates across the globe: rotted, burned, or consumed? *Global Change Biol.* 15, 2431–49.
- Croxen, M. A., Law, R.J., Scholz, R., Keeney K.M., Wlodarska, M. y Finlay B. B. (2013) Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 26, 822–880.
- Cumberland, S. (2009) Mosquito wars. *Bull World Health Organ*, 87, 167–168.
- Cutiño-Jiménez, A.M., Martins-Pinheiro, M., Lima, W.C., Martín-Torner, A., Morales, O.G. y Menk, C.F. (2010) Evolutionary placement of Xanthomonadales based on conserved protein signature sequences. *Mol. Physiol. Evol.* 54, 524–534.
- Daniel, R. (2005) The metagenomics of soil. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 470–478.
- Darby A.C., Lagnel, J., Matthew, C.Z., Bourtzis, K., Maudlin, I., Welburn, S.C. (2005) Extrachromosomal DNA of the symbiont *Sodalis glossinidius*. *J. Bacteriol.* 187, 5003–5007.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R. y Posada, D. (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9, 772–772.
- Davies, J. y Davies, D. (2010) Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiol Mol. Biol. Rev.* 74 417–433.
- De Filippo, C., Cavalieri, D., Di Paola, M., Ramazzotti, M., Poullet, J.B., Massart, S., Collini, S., Pieraccini, G. y Lionetti, P. (2010) Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 14691–14696.
- Degnan, P.H., Leonardo, T.E., Cass, B.N., Hurwitz, B., Stern, D., Gibbs, R.A., Richards, S., Moran, N.A. (2009) Dynamics of genome evolution in facultative symbionts of aphids. *Environ. Microbiol.* doi: 10.1111/j.1462–2920.2009.02085.x
- DeLeo, F. R. y Chambers, H. F. (2009) Reemergence of antibiotic-resistant *Staphylococcus aureus* in the genomics era. *J. Clin. Invest.* 119, 2464–2474.
- Depardieu, F., Podglajen, I., Leclercq, R., Collatz, E. y Courvalin, P. (2007) Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 79–114.

- DeSantis Jr, T.Z., Hugenholtz, P., Keller, K., Brodie, E.L., Larsen, N., Piceno, Y.M. *et al.* (2006) NAST: a multiple sequence alignment server for comparative analysis of 16S *rRNA* genes. *Nuc. Ac. Res* 34, W394–W399.
- Devriese, L. A., De Herdt, P., Uyttendaele, E., Lepoudre, C., Ducatelle R., Dom, P., y Haesebrouck, F. (1994) Streptococcal en enterococcal infections bij vogels. *Vlaams Diergen. Tijdschr.* 63, 109–111.
- Dillon, R.J. y Dillon, V.M. (2004) The gut bacteria of insects: Nonpathogenic Interactions. *Ann. Rev. Entomol.* 49, 71–92.
- Dillon, R.J., Vennard, C.T., Buckling, A. y Charnley A.K. (2005) Diversity of locust gut bacteria protects against pathogen invasion. *Ecol. Let.* 8, 1291–1298.
- Dinparast, N, Jazayeri, H., Raz, A, Favia, G, Ricci, I y Zakeri S. (2011) Identification of the midgut microbiota of *An. stephensi* and *An. maculipennis* for their application as a paratransgenic tool against malaria. *PLoS One*, 6, e28484.
- Dominguez-Bello, M. G., Costello, E. K., Contreras, M., Magris, M., Hidalgo, G., Fierer, N., Knight, R. (2010) Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 11971–11975.
- Douglas, A.E., Beard, C.B. (1996) Microbial symbioses in the midgut of insects. In: Lehane MJ, Billingsley PF, editors. *In the insect midgut*. Chapman y Hall. pp. 419–431.
- Dowd, S. E., Callaway T. R., Wolcott, R. D., Sun, Y., McKeehan, T., *et al.* (2008) Evaluation of the bacterial diversity in the feces of cattle using 16S rDNA bacterial tag-encoded FLX amplicon pyrosequencing (bTEFAP) *BMC Microbiol.* 8, 125.
- Drees, K.P., Neilson, J.W., Betancourt, J.L., Quade, J., Henderson, D.A., Pryor, B.M. y Maier, R.M. (2006) Bacterial community structure in the hyperarid core of the Atacama Desert, Chile. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7902–7908.
- Du Toit, C.A., Scholtz, C.H. y Hyman, W.B., (2008) Prevalence of the dog nematode *Spirocerca lupi* in populations of its intermediate dung beetle host in the Tshwane (Pretoria) Metropole, South Africa. *J. Vet. Res.* 75, 315–321.

- Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S. R., Nelson, K.E. y Relman, D.A. (2005) Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science* 308, 1635–1638.
- Edward, E. y Morse, M.D. (1988) Toxic effects of drugs on erythrocytes. *Ann. Clin. Sci.* 18, 13–18.
- Egert, M., Wagner, B., Lemke, T., Brune, A. y Friedrich, M.W. (2003) Microbial community structure in midgut and hindgut of the humus-feeding larva of *Pachnoda ephippiata* (Coleoptera: Scarabaeidae) *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 6659–6668.
- Egert, M., Stingl, U., Bruun, L.D., Pommerenke, B., Brune, A. y Friedrich, M.W. (2005) Structure and topology of microbial communities in the major gut compartments of *Melolontha melolontha* larvae (Coleoptera: Scarabaeidae) *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 4556–4566.
- Eilmus, S. y Heil, M. (2009) Bacterial associates of arboreal ants and their putative functions in an obligate ant-plant mutualism. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 4324–4332.
- Elisha, B. G. y Courvalin, P. (1995) Analysis of genes encoding D-alanine: D-alanine ligase-related enzymes in *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus* spp. *Gene* 152, 79-83.
- Elliott, J.A. y Facklam, R.R. (1996) Antimicrobial susceptibilities of *Lactococcus lactis* and *Lactococcus garvieae* and a proposed method to discriminate between them. *J. Clin. Microbiol.* 34, 1296–1298.
- Ellis, P.J., Conrads, T., Hille, R. y Kuhn, P. (2001) Crystal structure of the 100kDa arsenite oxidase from *Alcaligenes faecalis* in two crystal forms at 1.64 Å and 2.03 Å. *Structure* 9, 125–132.
- Engel, P. y Moran, N. A. (2013) The gut microbiota of insects -diversity in structure and function. *FEMS Microbiol Rev* 37, 699–735.
- Engeszer, R. E., Pattersonm, L. B., Rao, A. A. y Parichy D. M. (2007) Zebrafish in the wild: a review of natural history and new notes from the field. *Zebrafish* 4, 21–40.

- Estes, A.M., Hearn, D.J., Snell-Rood, E.C. *et al.* (2013) Brood ball-mediated transmisión of microbiome members in the dung beetle, *Onthophagus Taurus* (Coleoptera: Scarabaeidae) PloS One 8, e79061.
- Etheridge, M.E and Vonderfecht, S.L. (1992) Diarrhea caused by a slow-growing *Enterococcus* like agent in neonatal rats. Lab. Animal Science 42, 548–550.
- Evans, J.D. y Lopez, D.L. (2004) Bacterial probiotics induce an immune response in the honey bee (Hymenoptera: Apidae) J. Econ. Entomol. 97, 752–756.
- Facklam, R.R., Pigott, N.E. y Collins, M.D (1990) Identification of *Lactococcus* species from human sources. Proceeding of the XI Lancefield International Symposium on *Streptococci* and *Streptococcal* Diseases, Siena, Italy. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 127.
- Fajardo, A. y Martinez, J. L. (2008) Antibiotics as signals that trigger specific bacterial responses. Curr. Opin. Microbiol. 11, 161–167.
- Fava, F., Lovegrove, J.A., Gitau, R., Jackson, K.G. y Tuohy K.M. (2006) The gut microbiota y lipid metabolism: Implications for human health and coronary heart disease. Curr. Med. Chem. 13, 3005–3021.
- Feil, E.J., Maiden, M.C. , Achtman, M. y Spratt, B.G. (1999) The relative contributions of recombination and mutation to the divergence of clones of *Neisseria meningitidis*. Mol. Biol. Evol. 16, 1496–1502
- Felsenstein, J. (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. J. Mol. Evol. 17, 368–376
- Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evol. 39, 783–791.
- Ferrara, A. M. (2006) Potentially multidrug-resistant non-fermentative Gram-negative pathogens causing nosocomial pneumonia. Int. J. Antimicrob. Agents 27, 183–195.
- Fincher, G.T. (1975) Effects of dung beetle activity on number of nematode parasites acquired by grazing cattle. J. Parasitol. 61, 759–762.
- Fincher, G.T. (1981) The potential value of dung beetles in pasture Ecosystems. J. Georgia Entomol. So. 16, 316–333.

- Forgetta, V., Rempel, H., Malouin F., Vaillancourt, R., Topp, E., Dewar, K. y Diarra, M.S. (2012) Pathogenic and multidrug-resistant *Escherichia fergusonii* from broiler chicken. *Poultry Sci.* 91, 512–525
- Fox-Dobbs, K., Doak, D. F., Brody A. K. y Palmer, T. M. (2010) Termites create spatial structure and govern ecosystem function by affecting N₂ fixation in an East African savanna. *Ecology* 91, 1296–1307.
- Fraenkel, G. y Printy G.E. (1954) The amino acids requirements of the confused flour beetle, *Tribolium confusum*, Duval. *Biol. Bull.* 106, 149–157.
- Gaio, A.O., Gusmao, D.S., Santos, A.V., Berbert-Molina, M.A., Pimenta, P.F. y Lemos, F.J. (2011) Contribution of midgut bacteria to blood digestion and egg production in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) (L.) Par. *Vect.* 4, 105.
- Gantois, I., Ducatelle, R., Pasmans, F., Haeseb-Rouck, F., Gast, R., *et al.* (2009) Mechanisms of egg contamination by *Salmonella Enteritidis*. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 718–738.
- Gao, B., Mohan, R. y Gupta, R.S. (2009) Phylogenomics and protein signatures elucidating the evolutionary relationships among the Gammaproteobacteria. *IJSEM* 59, 234–247.
- García-Díaz, C., Ponce-Noyola, M. T., Esparza-García, F., Rivera-Orduña, F., y Barrera-Cortés, J. (2013) PAH removal of high molecular weight by characterized bacterial strains from different organic sources. *Int. Biodet. Biodeg.* 85, 311–322.
- Gardete, S., Aires-De-Sousa, M., Faustino, A., Ludovice, A. M., de Lencastre, H. (2008) Identification of the first vancomycin intermediate-resistant *Staphylococcus aureus* (VISA) isolate from a hospital in Portugal. *Microb. Drug Resist.* 14, 1–6.
- Garrity G.M., Bell, J.A. y Lilburn, T.G. (2003) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. In: Garrity GM, Bell JA, Lilburn TG, editors. Technology. pp. 1–397.
- Gavriel, S., Jurvetich, E., Gazit, Y. y Yuval, B. (2011) Bacterially enriched diet improves sexual performance of sterile male Mediterranean fruit flies. *J. Appl. Entomol.* 135, 564–573.
- Gayatri Priya, N., Ojha, A., Kajla, M.K., Raj, A. y Rajagopal, R. (2012) Host plant induced variation in gut bacteria of *Helicoverpa armigera*. *PloS One* 7, e30768.

- Gaynes, R. y Edwards, J. R. (2005) Overview of nosocomial infections caused by Gram-negative bacilli. Clin. Infect. Dis. 41, 848–854.
- Genersch, E. (2010) Honey bee pathology: current trends to Honey bees and beekeeping. Appl. Microbiol. Biotechnol. 87, 87–97.
- Gentry T. J., Wickham, G. S., Schadt, C. W., He, Z. y Zhou, J. (2006) Microarray application in microbial ecology research. Microb. Ecol. 52, 159–175.
- Gianoulis, T. A., Raes, J., Patel, P. V., Bjornson, R., Korbel, J. O., Letunic, I., Yamada, T., Paccanaro, A., Jensen, L. J., Snyder, M., *et al.* (2009) Quantifying environmental adaptation of metabolic pathways in metagenomics. Proc. Natl. Acad. Sci. 106, 1374–1379.
- Gillings, M., Boucher, Y., Labbate, M., Holmes, A., Krishnan, S.S., Holley M. y Stokes, H.W. (2008) The evolution of class 1 integrons and the rise of antibiotic resistance. J. Bacteriol. 190, 5095–5100.
- Giovannoni, S.J. y Stingl, U. (2005) Molecular diversity and ecology of microbial plankton. Nature 437, 343–348.
- Gniadkowski, M. (2008) Evolution of extended-spectrum beta-lactamases by mutation. Clin. Microbiol. Infect. 14 (Suppl. 1), 11–32. 64.
- Godoy-Vitorino, F., Goldfarb, K.C., Karaoz, U., Leal, S., Garcia-Amado, M.A., Hugenholtz, P., Tringe, S.G., Brodie, E.L. y Dominguez-Bello, M.G. (2012) Comparative analyses of foregut and hindgut bacterial communities in hoatzins and cows. ISME J. 6, 531–541.
- Gosalbes, M.J., Latorre, A., Lamelas, A. y Moya, A. (2010) Genomics of intracellular symbionts in insects. Int. J. Med. Microbiol. 300, 271–278.
- Gosalbes, M.J., Durbán, A., Pignatelli, M., Abellan, J.J., Jiménez-Hernández, N., *et al.* (2011) Metatranscriptomic approach to analyze the functional human gut microbiota. PloS One 6, 9.
- Gottlieb, Y., Markovics, A., Klement, E., Naor, S., Samish, M., Aroch, I. y Lavy E. (2011) Characterization of *Onthophagus sellatus* as the major intermediate host of the dog esophageal worm *Spirocerca lupi* in Israel. Vet. Parasitol. 80, 378–382.
- Goyache, J., Vela, A.I., Gibello, A., Blanco, M.M., Briones, V., González, S., Téllez, S., Ballesteros, C., Domínguez, L. y Fernández-Garayzabal, J.F. (2001) *Lactococcus*

- lactis* subsp. *lactis* Infection in waterfowl: First confirmation in animals. *Emerg. Infect. Dis.* 7, 884–886.
- Graczyk, T. K., Knight, R., Gilman, R. y Cranfield, M. (2001) The role of non-biting flies in the epidemiology of human infectious diseases. *Microbes Infect.*, 3, 231–235.
- Gray N.D. y Head, I.M. (2001) Linking genetic identity and function in communities of uncultured bacteria. *Environ. Microbiol.* 3, 481–492.
- Grayson, L. (2012) The evolving threat of antimicrobial resistance: options for action. Organización Mundial de la Salud
- Grimont, F. y Grimont, P. A. D. (1992) The genus *Serratia*. In *The Prokaryotes*, pp. 2822–2848. Publicado por New York: Springer.
- Guindon, S., Dufayard, J.F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W. y Gascuel, O. (2010) New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* 59, 307–321.
- Gusmão, D. S., Santos, A. V., Marini, D.C., Bacci, M. Jr, Berbert-Molina, M. A. y Lemos F. J. A. (2010) Culture-dependent and culture-independent characterization of microorganisms associated with *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) (L.) and dynamics of bacterial colonization in the midgut. *Acta Trop.* 115, 275–281.
- Gutiérrez-Bustos, D.C., Marín, A.M. y Corrales, L.C. (2009) *Pseudomonas oryzae*: un microorganismo de creciente interés científico. *NOVA* 7: 103–112
- Hakenbeck, R. (1998) Mosaic genes and their role in penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Electrophoresis* 19, 597–601.
- Halffter, G. y Matthews, E.G. (1966) The natural history of dung beetles of the subfamily Scarabaeinae (Coleoptera: Scarabaeidae) *Folia Entomol. Mex.* 12/14, 1–312.
- Hall, B.G. (2004) Predicting the evolution of antibiotic resistance genes. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 430–435.
- Hall, R.M. y Collis, C. M (1995) Mobile gene cassettes and integrons: Capture and spread of genes by site-specific recombination. *Mol. Microbiol.* 15, 593–600.
- Hall, R.M., Collis, C.M., Kim, M.J., Partridge, S.R., Recchia, G.D. y Stokes, H.W. (1999) Mobile gene cassettes and integrons in evolution. *Ann. NY. Acad. Sci.* 870, 68–80.

- Hancock, R. E. (1998) Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative Gram-negative bacteria. Clin. Infect. Dis. 27, S93–S99.
- Hancock, R. E. y Speert, D. P. (2000) Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and impact on treatment. Drug Resist. Updat. 3, 247–255.
- Hanski, I. y Cambefort, Y. (1991) Dung Beetle Ecology. U.K.: Princeton University Press.
- Herd, R. M. y Dawson, T. J. (1984) Fiber digestion in the Emu, *Dromaius novaehollandiae*, a bird with a simple gut and high rates of passage. Physiol. Zoo. 57, 70–84.
- Hernández, N., Escudero, J.A., San Millán, Á., González-Zorn, B., Lobo, J. M., Verdú, J.R. y Suarez, M. (2013) Culturable aerobic and facultative bacteria from the gut of the polyphagic dung beetle *Thorectes lusitanicus* Jeckel. Insect Science (in press)
- Hitateguy P., Caiata, L., Mota, M.I., Bazet, C. y Varela, G. (2012) Bacteremia por *Shigella flexneri* serotipo 6 en pacientes con SIDA. Presentación de dos casos clínicos. Rev. Chil. Infectol. 30, 94–97.
- Hoffmann, A.A., Montgomery B.L., Popovici, J., Iturbe-Ormaetxe, I., Johnson, P. H., et al. (2011) Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. Nature 476, 454–457.
- Hold, G.L., Pryde, S.E., Russell, V.J., Furrie, E. y Flint, H.J. (2002) Assessment of microbial diversity in human colonic samples by 16S rDNA sequence analysis. FEMS Microbiol. Eco. 39, 33–39.
- Holmes, A.J., Gillings, M.R., Nield, B.S., Mabbutt, B.C., Nevalainen, K.M. y Stokes, H.W. (2003) The gene cassette metagenome is a basic resource for bacterial genome evolution. Environ. Microbiol. 5, 383–394.
- Hong, P-Y Croix, J.A., Greenberg, E., Gaskins, H.R. y Mackie, R.I. (2011) Pyrosequencing-based analysis of the mucosal microbiota in healthy individuals reveals ubiquitous bacterial groups and micro-heterogeneity. PloS One 6, e25042.
- Hongoh, Y. (2010) Diversity and genomes of uncultured microbial symbionts in the termite gut. Biosci. Biotechnol. Biochem. 74, 1145–1151.
- Hooper, L. V., Stappenbeck, T. S., Hong, C. V. y Gordon, J. I. (2003) Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity. Nature Immunol. 4, 269–273.

- Howden, H. F. (1955) Biology and taxonomy of north american beetles of the subfamily Geotrupinae, with revisions of the genera *Bolbocerosoma*, *Eucanthus*, *Geotrupes*, and *Peltotrupes* (Scarabacidae)
- Huang, S. y Zhang, H. (2013) The impact of environmental heterogeneity and life stage on the hindgut microbiota of *Holotrichia parallela* larvae (Coleoptera: Scarabaeidae) PloS One 8, e57169.
- Huang, S., Sheng, P. y Zhang, H. (2012) Isolation and identification of cellulolytic bacteria from the gut of *Holotrichia parallela* larvae (Coleoptera: Scarabaeidae) Int. J. Mol. Sci. 13, 2563–2577.
- Huang, S., y Zhang, H. (2013) The impact of environmental heterogeneity and life stage on the hindgut microbiota of *Holotrichia parallela* larvae (Coleoptera: Scarabaeidae) PloS One 8, e57169.
- Huber, H., Hohn, M.J., Rachel, R., Fuchs, T., Wimmer, V.C. y Stetter, K.O. (2002) A new phylum of Archaea represented by a nano-sized hyperthermophilic symbiont. Nature 417, 63–67.
- Hugenholtz, P. y Tyson, G.W. (2008) Metagenomics. Nature 455, 481–483.
- Hughes, V., Datta, N. (1983) Conjugative plasmids in bacteria of the ‘pre-antibiotic’ era. Nature 21, 725-726.
- Huycke, M.M., Sahm, D.F. y Gilmore, M.S. (1998) Multiple-drug resistant Enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future”. EID J. 4, 239–249.
- Ishii, S., Yamamoto, M., Kikuchi, M., Oshima, K., Hattori, M., Otsuka, S. y Senoo, K.M. (2009) Microbial populations responsive to denitrification-inducing conditions in rice paddy soil, as revealed by comparative 16S *rRNA* gene analysis. Appl. Environ. Microbiol. 75, 7070–7078.
- Islam, E., Dhal, P. K., Kazy, S. K. y Sar, P. (2011) Molecular analysis of bacterial communities in uranium ores and surrounding soils from Banduhurang open cast uranium mine, India: A comparative study. J. Environ. Sci. Heal. Part A Toxichazardous Subst. Environ. Eng. 46, 271–280.
- Jakobsson, H. E., Jernberg, C., Andersson, A. F., Sjolund-Karlsson, M., Jansson, J.K. y Engstrand, L.. (2010) Short-term antibiotic treatment has differing long- term impacts on the human throat and gut microbiome. PLoS One, 5, e9836.

- Jessee, M.T., Schilling, R.W. y Stunkaro, J.A. (1970) Identification of intestinal eggs in Old World primates. *Lab. Anim. Care* 20, 83–87.
- Jimenez, E., Marin, M. L., Martin, R., Odriozola, J. M., Olivares M, *et al.* (2008) Is meconium from healthy newborns actually sterile?. *Res.Microbiol.* 159, 187–193.
- Kaltenpoth, M. (2009) Actinobacteria as mutualists: general healthcare for insects? *Trends Microbiol.* 17, 529–535.
- Kansouzidou, A., Charitidou, C., Poubrou, E., Daniilidis, V.D. y Tsagaropoulou, H. (2000) Haemorrhagic popular rash associated to *Flavimonas oryzihabitans* bacteraemia in a child. *Europ. J. Epidemiol.* 16, 277–279.
- Katoh, K. y Toh, H. (2008) Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. *Brief. Bioinform.* 9, 286–298.
- Keeling, C.I., Yuen, M.M., Liao, N.Y., Docking, T.R., Chan, S.K. *et al.* (2013) Draft genome of the mountain pine beetle, *Dendroctonus ponderosae* Hopkins, a major forest pest. *Genome Biol.* 14, R27, 1–19.
- Kellogg, D. S., Peacock J., W. L., Deacon, W. E., Brown, L. y Pirkle, C. I. (1963) *Neisseria gonorrhoeae* I. Virulence genetically linked to clonal variation. *J. Bacteriol.* 85, 1274-1279.
- Kikuchi, Y., Hayatsu, M., Hosokawa, T., Nagayama, A., Tago, K. y Fukatsu, T. (2012) Symbiont-mediated insecticide resistance. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 109, 8618–8622.
- King, B.J., y Monis, P.T. (2006) Critical processes affecting *Cryptosporidium* oocyst survival in the environment. *Parasitol.* 134, 309–323.
- Kinoshita, K., Koyama, K., Takahashi, K., Kondo, N. y Yuasa, H. (2000) A new triterpenoid saponin from *Isolatocereus dumortieri*. *J. Nat. Prod.* 63, 701–703.
- Klemperer, H. G. y Lumaret, J. P. (1985) Life cycle and behaviour of the flightless beetles *Thorectes sericeus* Jekel, *T. albarracinus* Wagner, and *T. laevigatus cobosi* Baraud (Col. Geotrupidae) *An. S. Entomol. Fr.* 21, 425–431.
- Knapp, J. S., Tam, M. R., Nowinski, R. C., Holmes, K. K. y Sandström, E. G. (1984) Serological Classification of *Neisseria gonorrhoeae* with Use of Monoclonal Antibodies to Gonococcal Outer Membrane Protein I. *J. Infect. Dis.* 150, 44-48.

- Kohl, K. M. y Dearing, D. (2012) Experience matters: prior exposure to plant toxins enhances diversity of gut microbes in herbivores. *Ecol. Lett.* 15, 1008–15.
- Köhler, T., Dietrich, C., Scheffrahn, R. H. y Brune, A. (2012) High-resolution analysis of gut environment and bacterial microbiota reveals functional compartmentation of the gut in wood-feeding higher termites (*Nasutitermes* spp.) *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 4691–701.
- Kovatcheva-Datchary P., Zoetendal, E.G., Venema, K., de Vos, W.M. y Smidt, H. (2009) Tools for the tract: understanding the functionality of the gastrointestinal tract *Ther. Adv. Gastroent.* 2, s9–s22.
- Kumarasamy, K. K., Toleman, M. A., Walsh, T. R., Bacteria, J., Butt, F., *et al.* (2010) Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *The Lancet* 10, 597–602.
- Kummerer, K. (2004) Resistance in the environment. *J. Antimicrob. Chemother.* 54, 311–320.
38. Levy S. B. 2002. (a) The antibiotic paradox: how misuse of antibiotics destroys their curative powers. Perseus, Cambridge, United Kingdom.
39. Levy S. B. 2002. (b) Factors impacting on the problem of antibiotic resistance. *J. J. Antimicrob. Chemother.* 49, 25–30.
- Kurokawa, K., Itoh, T., Kuwahara, T., Oshima, K., Toh, H., *et al.* (2007) Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA. Res.* 14, 169–181.
- Lai, C.C., Cheng, A. *et al.* (2011) *Escherichia fergusonii* bacteremia in a diabetic patient with pancreatic cancer. *J. Clin. Microbiol.* 49, 4001–4002.
- Lapointe, J.M., Higgings, R., Barrette, M y Milette, S. (2000) *Enterococcus hirae* enteropathy with ascending cholangitis and pancreatitis in a kitten. *Vet. Pat.* 37, 282–284.
- Lauber, C. L., Hamady M., Knight, R., and Fierer, N. (2009) Pyrosequencing- based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 5111–5120.
- Lefevre, C., Charles, H., Vallier, A., Delobel, B., Farrel, B. y Heddi, A. (2004) Endosymbiont phylogenesis in the dryophthoridae weevils: evidence for bacterial replacement. *Mol. Biol. Evol.* 21, 965–973.

- Legatzki, A., Ortiz, M., Neilson, J.W., Dominguez, S., Andersen, G.L., Toomey R.S. *et al.* (2011) Bacterial and archaeal community structure of two adjacent calcite speleothems in Kartchner Caverns, Arizona, USA. *Geomicrobiol. J.* 28, 99–117.
- Lehman, R. M., Lundgren, J. G. y Petzke, L. M. (2009) Bacterial communities associated with the digestive tract of the predatory ground beetle, *Poecilus chalcites*, and their response to laboratory rearing and antibiotic treatment. *Microb. Ecol.*, 57, 349–358.
- Ley R.E., Bäckhed, F., Turnbaugh, P., Lozupone, C.A., Knight, R.D. y Gordon, J.I. (2005) Obesity alters gut. *Microb. Ecol. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 11070–11075.
- Liebert, C. A., Hall, R. M. y Summers, A. O. (1999) Transposon Tn21, flagship of the floating genome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63,507–522.
- Lo, N. y Eggleton, P. (2011) Termite phylogenetics and co-cladogenesis with symbionts. In: Bignell DE, Yves R, Nathan L (eds) *Biology of termites: a modern synthesis*, 2nd ed. Springer, Heidelberg, Germany pp 27–50.
- Lo, N., Bandi, C., Watanabe, H., Nalepa, C. y Beninati T (2003) Evidence for cocladogenesis between diverse dictyopteran lineages and their intracellular endosymbionts. *Mol. Biol. Evol.* 20, 907–913.
- Long, K.S., Poehlsgaard, J., Kehrenberg, C., Schwartz, S. y Vester, B. (2006) The Cfr *rRNA* methyltransferase confers resistance to phenicols, lincosamides, oxazolidinones, pleuromutilins, and streptogramin A antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 2500–2505.
- López-Sánchez, M. J., Neef, A., Patino-Navarrete, R., Navarro, L., Jimenez, R. *et al.* (2008) *Blattabacteria*, the endosymbionts of cockroaches, have small genome sizes and high genome copy numbers. *Environ. Microbiol.* 10, 3417–3422.
- López-Sánchez, M.J., Neef, A., Peretó, J., Patiño-Navarrete, R., Pignatelli, M., *et al.* (2009) Evolutionary convergence and nitrogen metabolism in *Blattabacterium* strain Bge, primary endosymbiont of the cockroach *Blattella germanica*. *PLoS Genet.* 5, e1000721.
- Lowenberger, C.A. *et al.* (1999) Mosquito–Plasmodium interactions in response to immune activation of the vector. *Exp. Parasitol.* 91, 59–69.
- Lundgren, J. G., y Lehman, R. M. (2010) Bacterial Gut Symbionts Contribute to Seed Digestion in an Omnivorous Beetle. *PLoS One* 5: 10.

- Lupp, C. y Finlay B.B. (2005) Intestinal microbiota. *Curr. Biol.* 15, R235–R236.
- Mabhegedhe, M. (2012) Analysis of *Euoniticellus intermedius*, larva gut micro-flora: Potential application in the production of biofuels. Master of Science Dissertation (unpublished), University of the Witwatersrand, Johannesburg.
- MacBeath, J.R., Harvey S.S. y Oldroyd, N.J. (2001) Automated fluorescent DNA sequencing on the ABI PRISM 377. *Methods Mol. Biol.* 167, 119–52.
- Maccaferri, S., Biagi, E. y Brigidi, P. (2011) Metagenomics: key to human gut microbiota. *Dig Dis.* 29, 525–30.
- Machida, M., Araki, J., Koyama, T., Kumada, M., Horii, Y., Imada, I., Takasaka, M., Honjo S., Matsubayashi, K. y Tiba, T. (1978) The life cycle of *Streptopharagus pigmentatus* (Nematoda, Spiruroidea) from the Japanese monkey. *Bull. Natl. Sci. Mus. Series A (Zoology)* 4, 1–9.
- Mackereth, G., Nokes, C., Holmes, J. y Hambling, T. (2013) The release of exotic pastoral dung beetles in New Zealand: A health risk assessment. *Inst. Environ. Sci. Res. Ltd. Porirua, New Zealand.*
- Mackie, R. I., Sghir, A. y Gaskins, H.R. (1999) Developmental microbial ecology of neonatal gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.* 69, 1035–1045.
- Macovei, L. y Zurek, L. (2006) Ecology of antibiotic resistance genes: characterization of Enterococci from houseflies collected in food settings. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4028–4035.
- MacOwan, K. J., Atkinson, M. J., Bell, M. A., Brand, T. F., Randall, C.J. (1984) Egg transmission of a respiratory isolate of *Mycoplasma synoviae* and infection of the chicken embryo. *Avian Pathol.* 13, 51–58.
- Madiyarov, R.S., Bektemirov, A.M., Ibadova, G.A., Abdukhalilova, G.K., Khodiev, Bodhidatte, L., *et al.* (2010) Antimicrobial resistance patterns and prevalence of class 1 and 2 integrons in *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* isolated in Uzbekistan. *Gut Pathogen* 2, 18–27.
- Magurran, A. E. (2005) Biological diversity. *Curr. Biol.* 15, R116–R118.
- Mahapatra, A., Mahapatra, S. y Mahapatra, A. (2005) *Escherichia fergusonii*: an emerging pathogen in South Orissa. *Indian J. Med. Microbiol.* 23, 204–206.

- Mahowald, M. A., Rey F. E., Seedorf, H., Turnbaugh, P. J., Fulton, R. S., *et al.* (2009) Characterizing a model human gut microbiota composed of members of its two dominant bacterial phyla. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 5859–5864.
- Maier, R.M., Palmer, M.W., Andersen, G.L., Halonen, M.J., Josephson, K.C., *et al.* (2010) Environmental determinants and impact on childhood asthma by the bacterial community in household dust. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 2663–2667.
- Maki, T., Hirono, I., Kondo, H. y Aoki, T. (2008) Drug resistance mechanism of the fish-pathogenic bacterium *Lactococcus garvieae*. *J. Fish Dis.* 31, 461–468.
- Mannion, P.T. and Rothburn, M.M. (1990) Diagnosis of bacterial endocarditis caused by *Streptococcus lactis* and assisted by immunoblotting of serum antibodies. *J. Infect. Dis.* 21, 317–318.
- Margulies M., Egholm, M., Altman, W.E., Attiya, S., Bader, J.S., Bemben, L.A *et al.* (2005) Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437, 376–380.
- Mariat, D., Firmesse, O., Levenez, F., Guimarães, V., Sokol, H., Doré, J., Corthier, G., Furet, J. P. (2009) The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol.* 9, 123.
- Marin, M., Viedma, D., Martín Rabadan, P., Rodríguez Creixems y M., Bouza, E. (1997) Infection of Hickman catheter by *Pseudomonas* (formerly *Flavimonas*) *oryzihabitans* traced to a synthetic bath sponge. *J. Clin. Microbiol.* 38, 4577–4579.
- Martín-Piera, F., y López-Colón, J.I. (2000) Coleoptera, Scarabaeoidea I. Fauna Iberica, vol. 14. Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC), Madrid.
- Martin, F. J., *et al.* (2007) A top-down systems biology view of microbiome-mammalian metabolic interactions in a mouse model. *Mol. Syst. Biol.* 3.
- Martínez-Falcón, A.P., Durbán, A., Latorre, A., Antón, J. y Marcos-García, M. (2011) Bacteria associated with *Copestylum* (Diptera, Syrphidae) larvae and their cactus host *Isolatocereus dumortieri*. *PloS One* 6, e27443.
- Martinez, J. L., Sanchez, M., Martinez-Solano, L., Hernandez, A., Garmendia, L., Fajardo, A. y Alvarez-Ortega, C. (2009b) Functional role of bacterial multidrug efflux pumps in microbial natural ecosystems. *FEMS Microbiol. Rev.* 33, 430–449.

- Martinson, V.G., Danforth, B.N., Minckley R.L., Rueppell, O., Tingek, S. y Moran, N.A. (2011) A simple and distinctive microbiota associated with honey bees and bumble bees. *Mol. Ecol.* 20, 619–628.
- Mathan, M. M., Mathan, V. I. y John, A. M. (1993) Electron microscopic study of the attachment and penetration of rabbit intestinal epithelium by *Providencia alcalifaciens*. *J. Pathol.* 171, 1096-9896.
- Mathison, B.A. y Ditrach, O. (1999) The fate of *Cryptosporidium parvum* oocysts ingested by dung beetles and their possible role in the dissemination of cryptosporidiosis. *J. Parasitol.* 85, 678–681.
- Matilla, M. A., Espinosa-Urgel, M., Rodríguez-Herva, J. J., Ramos, J. L. y Ramos-González, M. I. (2007) Genomic analysis reveals the major driving forces of bacterial life in the rhizosphere. *Genome Biol.* 8, R179.
- Matsui, H., Kato, Y., Chikaraishi, T., Moritani, M., Ban-Tokuda, T. y Wakita, M., (2010) Microbial diversity in ostrich ceca as revealed by 16S ribosomal RNA gene clone library and detection of novel *Fibrobacter* species. *Anaerobe* 16, 83–93.
- Matthew, C. Z., Darby A. C., Young, S. A., Hume, L. H. y Welburn, S. C. (2005) The rapid isolation and growth dynamics of the tsetse symbiont *Sodalis glossinidius*. *FEMS Microbiol. Lett.* 248, 69–74.
- Maurice, C. F., Haiser, H. J. y Turnbaugh, P. J. (2013) Xenobiotics shape the physiology and gene expression of the active human gut microbiome. *Cell* 152, 39–50.
- Maxam, A.M. y Gilbert, W. (1977) A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74, 560–4.
- Mazmanian, S. K., Liu, C. H., Tzianabos, A. O. y Kasper, D. L. (2005) An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell* 122, 107–118.
- McNally D.L., Mihelcic, J.R. y Lueking, D.R. (1999) Biodegradation of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons under aerobic and nitrate-reducing conditions. *Chemosphere* 38, 1313–1321.
- McPherson, M.J., Hames, B.D. y Taylor, G.R., (1995) PCR II. Oxford Univ. Press, UK.
- Melamede, R.J. y Wallace, S.S. (1985) A possible secondary role for thymine-containing DNA precursors. *Basic Life Sci.* 31, 67–102.

- Meroueh, S. O., Minasov, G., Lee, W., Shoichet, B. K. y Mobashery S. (2003) Structural aspects for evolution of beta-lactamases from penicillin-binding proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 125, 9612–9618.
- Miller, A., Chi-Rodriguez, E y Nichols, R.L. (1961) The fate of helminth eggs and protozoan cyst in human faeces ingested by dung beetles (coleopteran: Scarabaeidae) *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 10, 748–754.
- Minard, G., Mavingui, P., y Moro, C. V. (2013) Diversity and function of bacterial microbiota in the mosquito holobiont. *Parasites y Vectors* 6, 146.
- Mitsou, E. K., Kirtzalidou, E., Oikonomou, I., Liosis, G., Kyriacou, A. (2008) Fecal microflora of greek healthy neonates. *Anaerobe* 14, 94.
- Mittal, I.C. (1993) Natural manuring and soil conditioning by dung beetles. *Trop. Ecol.* 34, 150–159.
- Mittler, T.E. (1988) Applications of artificial feeding techniques for aphids, p. 145– 170. In A. K. Minks y P. Harrewijn (eds.), *Aphids: their biology natural enemies, and control*. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, The Netherlands, 43.
- Morales-Jiménez, J., Zúñiga, G., Ramírez-Saad, H. y Hernández-Rodríguez, C. (2012) Gut-associated bacteria throughout the life cycle of the bark beetle *Dendroctonus rhizophagus* Thomas and Bright (Curculionidae: Scolytinae) and their cellulolytic activities. *Microb. Ecol.* 64, 268–278.
- Mowlavi, G., Mikaeili, E., Mobedi, I., Kia, E., Masoomi, L. y Vatandoost, H. (2009) A survey of dung beetles infected with larval nematodes with particular note on *Copris lunaris* beetles as a vector for *Gongylonema* sp. in Iran. *Korean J. Parasitol.* 47, 13–17.
- Mrázek, J., Štrosová, L., Fliegerová, K., Kott, T. y Kopečný, J. (2008) Diversity of insect intestinal microflora. *Folia Microbiol.* 53, 229–233.
- Mukaratirwa, S., Pillay E. y Munsammy K. (2010) Experimental infection of selected arthropods with spirurid nematodes *Spirocerca lupi* Railliet y Henry 1911 and *Gongylonema ingluvicola* Molin, 1857. *J. Helminthol.* 84, 369–374.
- Mullen, G.L., y Durden, L.A., eds. (2002) *Med. Vet. Entomol.*, Academic Press, NY.
- Munson, M. A., Baumann, P., Clark, M. A., Baumann, L., Moran, N. A., Voegtlin, D. J., Campbell, B. C. (1991) Evidence for establishment of aphid-eubacterium

- endosymbiosis in an ancestor of four aphid families. *J. Bacteriol.* 173, 6321–6324.
- Murgas Torrazza, R. y Neu J. (2011) The developing intestinal microbiome and its relationship to health and disease in the neonate. *J. Perinatol.* 31, S29–34.
- Muyzer, G., Brinkhoff, T., Nübel, U., Santegoeds, C., Schäfer, H., y Wawer, C. (1998) Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in *Microb. Ecol.* p. 1–27. In Akkermans ADL, Van Elsas JD y de Bruijn FJ (ed.), *Molecular Microb. Ecol. manual*, vol. 3.4.4. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Needham, J. (1938) Contributions of chemical physiology to the problem of reversibility in evolution. *Biol. Rev.* 13, 225–251.
- Neilson, J.W., Jordan, F.L. y Maier, R.M. (2013) Analysis of artifacts suggests DGGE should not be used for quantitative diversity analysis. *J. Microbiol. Methods* 92, 256–263.
- Neu, H.C., Saha, G. y Chin, N. X. (1989) Resistance of *Xanthomonas maltophilia* to antibiotics and the effect of beta-lactamase inhibitors. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 12, 283–285.
- Nichols, E., Spector, S., Louzada, J., Larsen, T., Amezcua, S. y Favila, M.E. (2008) Ecological functions and ecosystem services provided by Scarabaeinae dung beetles. *Biol. Conserv.* 141, 1461–1474.
- Nicholson, J. K. y Wilson, I. D. (2003)- Opinion: understanding 'global' systems biology: metabonomics and the continuum of metabolism. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2, 668–676.
- Nicholson, J.K., Holmes, E., Kinross, J., Burcelin, R., Gibson, G., *et al.* (2012) Host-gut microbiota metabolic interactions. *Science* 336, 1262–1267.
- Nordentoft, S., Mølbak, L., Bjerrum, L., De Vylder, J., Van Immerseel, F. y Pedersen, K., (2011) The influence of the cage system and colonisation of *Salmonella enteritidis* on the microbial gut flora of laying hens studied by T-RFLP and 454 pyrosequencing. *BMC Microbiol.* 11, 187.
- Nordmann, P., y Poirel, L. (2005) Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae. *J. Antimicrob. Chemother.* 56, 463–469.
- Norman, A., Hansen, L.H. y Sorensen, S.J. (2009) Conjugative plasmids: vessels of the communal gene pool. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 364, 2275–2289.

- Novick, R. P. y Geisinger, E. (2008) Quorum sensing in staphylococci. *Annu. Rev. Genet.* 42, 541–564.
- OMS, 134ª Reunión (EB134-R13), punto 10.6: La lucha contra la resistencia a los antimicrobianos incluida la resistencia a los antibióticos.
- O'Neill, S. L., Giordano, R., Colbert, A. M., Karr, T. L. y Robertson, H. M. (1992) 16S *rRNA* phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *PNAS* 89, 2699–2702.
- Oerke, E.C. (2006) Crop losses to pests. *J Agric Sci* 144, 31–43.
- Ortiz-Hernández, L. M., Sánchez-Salinas, E., Dantán-González, E., y Castrejón-Godínez, M. L. (2013) Pesticide Biodegradation: Mechanisms, Genetics and Strategies to Enhance the Process, *Biodegradation Life of Science*, Dr. Rolando Chamy (Ed.)
- Paine, T.D., Raffa, K.F. y Harrington, T.C. (1997) Interactions among scolytid bark beetles, their associated fungi, and live host conifers. *Annu. Rev. Entomol.* 42, 179–206.
- Park, D. S., Oh, H. W., Jeong, W. J., Kim, H., Park, H. Y. y Bae, K. S. (2007) A culture-based study of the bacterial communities within the guts of nine longicorn beetle species and their exo-enzyme producing properties for degrading xylan and pectin. *J. Microbiol.* 45, 394–401.
- Pascual, C., Collins, M. D. , Grimont, P. A. D., Dominguez, L. y Fernández-Garayzabal, J. F. (1996) *Sanguibacter inulinus* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46, 811-813.
- Pauchet, Y., Wilkinson, P., Chauhan, R. y Ffrench-Constant, R.H. (2010) Diversity of beetle genes encoding novel plant cell wall degrading enzymes. *PloS One* 5, e15635.
- Percudani, R. (2013) A microbial metagenome (*Leucobacter* sp.) in *Caenorhabditis* whole genome sequences. *Bioinform. Biol. Insights* 24, 55-72.
- Pérez-Ramos, I.M. (2007) Factores que condicionan la regeneración natural de especies leñosas en un bosque mediterráneo del sur de la Península Ibérica. *Ecosistemas* 16, 131–136.
- Pérez-Ramos, I.M., Marañón, T., Lobo, J.M. y Verdú, J.R. (2007) Acorn removal and dispersal by the dung beetle *Thorectes lusitanicus*: ecological implications. *Ecol. Entomol.* 32, 349–356.

- Pérez, F., Hujer, A.M., Hujer, K.M., Decker, B.K., Rather, P.N. y Bonomo, R.A. (2007) Global challenge of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob. Agents Chemother. 51, 3471–3484.
- Perz, J.F., Craig, A.S., Stratton, C.W., Bodner, S.J., Phillips, W.E. Jr y Schaffner, W. (2005) *Pseudomonas putida* septicemia in a special care nursery due to contaminated flush solutions prepared in a hospital pharmacy. J. Clin. Microbiol. 43, 5316–5318.
- Pessione, E. (2012) Lactic acid bacteria contribution to gut microbiota complexity: lights and shadows. Front. Cel. Infect. Microbiol. 2, 86.
- Petrie-Hanson, L., Romano, C. L., Mackey R. B., Khosravi, P., Hohn, C. M. y Boyle, C. R. (2007) Evaluation of zebra-fish *Danio rerio* as a model for Enteric Septicemia of Catfish (ESC) J. Aquat. Animal Health 19, 151–158.
- Petrosino, J.F., Highlander, S., Luna, R.A., Gibbs, R.A. y Versalovic, J. (2009) Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. Clin Chem. 55, 856–66.
- Piddock, L.J. (2006) Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. Clin. Microbiol. Rev. 19, 382–402.
- Pino, N. J., Domínguez, M. C. y Peñuela, G. A. (2011) Isolation of a selected microbial consortium capable of degrading methyl parathion and *p*-nitrophenol from a contaminated soil site. J. Environ. Sci. Health, Part B 46, 173–180.
- Plumb, J. A. (1999) *Edwardsiella* septicemias. In: Woo PTK, Bruno DW (eds), Fish Diseases and Disorders: Viral, Bacterial, and Fungal Infections. CAB International: Wallingford, UK, pp 479–521.
- Potrikus, C.J. y Breznak, J. A. (1981) Gut bacteria recycle uric acid nitrogen in termites: a strategy for nutrient conservation. P. Natl. Acad. Sci. USA 78, 4601–4605.
- Pressley M. E, Phelan III, P. E. , Witten, P. E., Mellon, M. T. y Kim, C. H. (2005) Pathogenesis and inflammatory response to *Edwardsiella tarda* infection in the zebrafish. Dev. Comp. Immunol. 29, 501–513.
- Priest, F.G. (2003) Rapid identification of microorganisms. Brewing Microbiology Tercera edición, 305–328. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.
- Pull, S. L., Doherty J. M., Mills, J. C., Gordon, J. I. y Stappenbeck, T. S. (2005) Activated macrophages are an adaptive element of the colonic epithelial progenitor niche

- necessary for regenerative responses to injury. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 102, 99–104.
- Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S. *et al.* (2010) A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 464, 59–65.
- Qu, A., Brulc, J. M., Wilson, M. K., Law, B. F., Theoret, J. R., Joens, L. A., Konkeli, M. E., Angly F., Dinsdale, E. A. y Edwards, R. A. (2008) Comparative metagenomics reveals host specific metaviromes and horizontal gene transfer elements in the chicken cecum microbiome. *PLoS One* 3, e2945.
- Quinn, J. P. (1998) Clinical problems posed by multiresistant nonfermenting Gram-negative pathogens. *Clin. Infect. Dis.* 27, S117–S124.
- Quintelas, C., Rocha, Z., Silva, B., Fonseca, B., Figueiredo, H., y Tavares, T. (2009) Removal of Cd(II), Cr(VI), Fe(III) and Ni(II) from aqueous solutions by an *E. coli* biofilm supported on kaolin. *Chem. Enginer, J.* 149, 319–324.
- Rae, R., Riebesell, M., Dinkelacker, I., Wang, Q., Herrmann, M., Weller, A.M., Dieterich, C. y Sommer, R.J. (2008) Isolation of naturally associated bacteria of necromenic *Pristionchus* nematodes and fitness consequences. *J. Exper. Biol.* 211, 1927–1936.
- Raffa, K. F., Aukema, B. H., Bentz, B. J., Carroll, A., Hicke, J. A., Turner, M. G. y Romme, W. H. (2008) Cross-scale drivers of natural disturbances prone to anthropogenic amplification: the dynamics of bark beetle eruptions. *Bioscience* 58, 501–618.
- Ransom, B. H. y Hall, M. C. (1917) A further note on the life-history of *Gongylonema scutatum*. *J. Parasitol.* 3, 177–181.
- Ravel, J., Gajer, P., Abdo, Z., Schneider, G. M., Koenig, S. S., *et al.* (2011) Vaginal microbiome of reproductive-age women. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108, 4680–4687.
- Rayamajhi, N., Cha, S. B., Shin, S. W., Jung, B. Y. y Yoo, H. S. (2011) Plasmid typing and resistance profiling of *Escherichia fergusonii* and other *Enterobacteriaceae* isolates from South Korean farm animals. *App. Envir. Microbiol.* 77, 3136–3166.
- Recchia, G. D. y Hall, R. M. (1995) Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiol.* 141, 3015–3027.

- Redfearn, A. y Pimm, S. L. (1988) Population variability and polyphagy in herbivorous insect communities. *Ecol. Monog.* 58, 39–55.
- Ricci, I., Valzano, M., Ulissi, U., Epis, S. y Cappelli, A. (2012) Symbiotic control of mosquito borne disease. *Pathog. Glob. Health.* 106, 380–385.
- Riesenfeld, C. S., Schloss, P. D. y Handelsman, J. (2004) Metagenomics: genomic analysis of microbial. *Microbiol. Biotechnol.* 75, 955–962.
- Rodríguez-Estévez, V., García Martínez, A., Moreno, C.M., Perea Muñoz, J. y Gómez Castro, A. (2008) Dimensiones y características nutritivas de las bellotas de los *Quercus* de la dehesa. *Arch. Zootec.* 57, 1–12.
- Roesch, L. F., Fulthorpe, R. R., Riva, A., Casella, G., Hadwin, A. K., *et al.* (2007) Pyrosequencing enumerates and contrasts soil microbial diversity. *ISME J.* 1, 283–290.
- Roeselers, G., Mittge, E. K., Stephens, W. Z., Parichy D. M., Cavanaugh, C. M. *et al.* (2011) Evidence for a core gut microbiota in the zebrafish. *ISME J.* 5, 1595–1608.
- Ronaghi, M., Karamohamed, S., Pettersson, B., Uhlen, M. y Nyren, P. (1996) Real-time DNA sequencing using detection of pyrophosphate release. *Anal. Biochem* 242, 84–89.
- Rook, G.A. (2010) 99th Dahlem conference on infection, inflammation and chronic inflammatory disorders: darwinian medicine and the 'hygiene' or 'old friends' hypothesis. *Clin Exp Immunol.* 160, 70–9.
- Rosselló-Mora, R. y Amann, R. (2001) The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol. Rev.* 25, 39–67.
- Ruiz-Sánchez, A., Cruz-Camarillo, R., Salcedo-Hernández, R., y Barboza-Corona, J. E. (2005) Chitinases from *Serratia marcescens* Nima. *Biotechnol. Lett.* 27, 649–653.
- Ryan, U., Yang, R., Gordon, C. y Doube, B. (2011) Effect of dung burial by the dung beetle *Bubas bison* on numbers and viability of *Cryptosporidium* oocysts in cattle dung. *Exper. Parasitol.* 129, 1–4.
- Saitoh, Y. y Itagaki, H. (1990) Dung beetles, *Onthophagus* spp., as potential transport hosts of feline coccidia. *N. J. Zas.*, 52, 293–297.
- Salyers, A. A. (2002) An overview of the genetic basis of antibiotic resistance in bacteria and its implications for agriculture. *Anim. Biotechnol.* 13, 1–5.

- Salyers, A. A., Gupta, A. y Wang, Y. (2004) Human intestinal bacteria as reservoirs for antibiotics resistance genes. *Trends Microbiol.* 12, 412–416.
- Sanahuja, G., Banakar, R., Twyman, R.M., Capell, T. y Christou, P. (2011) *Bacillus thuringiensis*: a century of research, development and commercial applications. *Plant. Biotechnol. J.* 9, 283–300.
- Sanders, J. L., Watral, V. y Kent, M. L. (2012) Microsporidiosis in zebrafish research facilities. *ILAR J.* 53, 106–113.
- Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain– terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 74(12), 5463–7.
- Sasikala, S. y Sundararaj, T. (2012) Satokari, R. M., Vaughan, E. E., Akkermans, A. D., Saarela, M. y de Vos, W. M. (2001) Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 504–513.
- Savini, V., *et al.* (2008) Multidrug-resistant *Escherichia fergusonii*: a case of acute cystitis. *J. Clin. Microbiol.* 46, 1551–1552.
- Schauer, C., Thompson, C. L. y Brune, A. (2012) The bacterial community in the gut of the cockroach *Shelfordella lateralis* reflects the close evolutionary relatedness of cockroaches and termites. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 2758–2767.
- Schröder, D., Deppisch, H., Obermayer, M., Krohne, G., Stackebrandt, E., Holldober, B., Goebel, W. y Gross, R. (1996) Intracellular endosymbiotic bacteria of *Camponotus* species (carpenter ants): systematics, evolution and ultrastructural characterization. *Mol Microbiol* 21, 479–489.
- Scully E. D., Geib, S. M., Hoover, K., Tien, M., Tringe, S. G., *et al.* (2013) Metagenomic profiling reveals lignocellulose degrading system in a microbial community associated with a wood–feeding beetle. *PloS One* 8, e73827.
- Scupham, A. J., Patton, T. G., Bent, E. y Bayles, D. O. (2008) Comparison of the cecal microbiota of domestic and wild turkeys. *Microb. Ecol.* 56, 322–331.
- Secil, E. S., Sevim, A., Demirbag, Z., Demir, I. (2012) Isolation, characterization and virulence of bacteria from *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae) *Biologia* 67, 767–776.

- Seipke, R., Barke, J., Ruiz-Gonzalez, M. X., Orivel, J., Yu, D. W. y Hutchings, M. I. (2012) Fungus-growing *Allomerus* ants are associated with antibiotic-producing actinobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 101, 443–447.
- Sevim, A., Gokce, C., Erbas, Z. y Ozkan, F. (2012) Bacteria from *Ips sexdentatus* (Coleoptera: Curculionidae) and their biocontrol potential. *J. Basic Microbiol.* 52, 695–704.
- Shannon, C. E. (1948) A mathematical theory of communication. *Bell. Sys. Tech. J.* 27, 379–423.
- Shepherd, V. E. y Chapman, C. A. (1998) Dung beetles as secondary seed dispersers: impact on seed predation and germination. *J. Trop. Ecol.* 14, 199–215.
- Shi, W., Syrenne, R., Sun, J. Z. y Yuan, J. S. (2010) Molecular approaches to study the insect gut symbiotic microbiota at the ‘omics’ age. *Insect Science* 17, 199–219.
- Shi, W., Xie, S., Chen, X., Sun, S., Zhou, X. *et al.* (2013) Comparative genomic analysis of the microbiome of herbivorous insects reveals eco-environmental adaptations: biotechnology applications. *PLoS Genet* 9, e1003131.
- Shi, Y., Tyson, G. W. y DeLong, E. F. (2009) Metatranscriptomics reveals unique microbial small RNAs in the ocean’s water column. *Nature* 459, 266–269.
- Shoemaker, N. B., Vlamakis, H., Hayes, K. y Salyers, A. A. (2001) Evidence for extensive resistance gene transfer among *Bacteroides* spp. and among *Bacteroides* and other genera in the human colon. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 561–568. 127.
- Skrodenyte-Arbaciauskieneskrodenyte’ V, Sruoga, A y Butkauskas, D (2006) Assessment of microbial diversity in the river trout *Salmo trutta fario* L. intestinal tract identified by partial 16S *rRNA* gene sequence analysis. *Fisheries Sci.* 72, 597–602.
- Smarda, Jan (1987) Production of bacteriocin-like agents of *Budvicia aquatica* and “*Pragia fontium*”. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. Series A: Medical Microbiology, Infectious Diseases, Virology, Parasitology*, 265, 74–81.
- Smith, P. A. y Romesberg, F. E. (2007) Combating bacteria and drug resistance by inhibiting mechanisms of persistence and adaptation. *Nat. Chem. Biol.* 3, 549–556.

- Sommer, M. O. A., Dantas, G. y Church, G. M. (2009) Functional characterization of the antibiotic resistance reservoir in the human microflora. *Science* 325, 1128–1131.
- Song, D. J., Kang, H. Y., Wang, J. Q., Peng, H. y Bu, D. P. (2014) Effect of Feeding *Bacillus subtilis natto* on Hindgut Fermentation and Microbiota of Holstein Dairy Cow. *AJAS* 27, 495–502.
- Sorek, R., Cossart, P. (2009) Prokaryotic transcriptomics: a new view on regulation, physiology and pathogenicity. *Nat. Rev. Genet.* 11, 9–16.
- Springman, A. C., Lacher, D. W., Wu, G., N. Milton, N., Whittam, T. S., Davies, H. D y Manning, S. D. (2009) Selection, recombination, and virulence gene diversity among group B streptococcal genotypes. *J. Bacteriol.* 191, 5419–5427.
- Stackebrandt, E., Murray R.G.E. y Trüper, H.G. (1988) Proteobacteria classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the “purple bacteria and their relatives”. *IJSEM* 38, 321–325.
- Stevens, C. y Humen, I. D. (1995) Comparative physiology of the vertebrate digestive system. Cambridge University Press.
- Stevens, C.E. y Hume, I.D. (1998) Contributions of microbes in vertebrate gastrointestinal tract to production and conservation of nutrients. *Physiol. Rev.* 78, 393–427.
- Stock, I. y Wiedemann, B. (2002) Natural antibiotic susceptibility of *Enterobacter amnigenus*, *Enterobacter cancerogenus*, *Enterobacter gergoviae* and *Enterobacter sakazakii* strains. *CMI* 8, 564–578.
- Stokes, H. W., y Hall, R. M. (1989) A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol. Microbiol.* 3, 1669–1683.
- Stuart, B. L. y Marshall, B. (2004) Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Medicine* 10, 122–129.
- Suh, S. O., Marshall, C. J., McHugh, J. V. y Blackwell, M. (2003) Wood ingestion by passalid beetles in the presence of xylose fermenting gut yeasts. *Mol. Ecol.* 12, 3137–3145.
- Tamae, C. *et al.* (2008) Determination of antibiotic hypersensitivity among 4000 single-gene-knockout mutants of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 190, 5981–5988.

- Tamames, J., Abellán, J. J., Pignatelli, M., Camacho, A. y Moya, A. (2010) Environmental distribution of prokaryotic taxa. *BMC Microbiol.* 10.
- Tang, X., Freitak, D., Vogel, H., Ping, L., Shao, Y., *et al.* (2012) Complexity and variability of gut commensal microbiota in polyphagous lepidopteran larvae. *PLoS One* 7: e36978.
- Tejedor, J. L., Vela, A. I., Gibello, A., Casamayor, A., Dominguez, L. y Fernández-Garayzabal, J. F. (2011) A genetic comparison of pig, cow, and trout isolates of *Lactococcus garveae* by PFGE analysis. *Lett. Appl. Microbiol.* 53, 614–619.
- Terenius, O., Lindh, J. M., Eriksson-Gonzales, K., Bussière, L., Laugen, A. T., Bergquist, H., Titanji, K. y Faye I. (2012) Midgut bacterial dynamics in *Aedes aegypti*. *FEMS Microbiol. Ecol.* 80, 556–565.
- Thao, M. L., Moran, N. A., Abbot, P., Brennan, E. B., Burckhardt, D. H., Baumann, P. (2000) Cospeciation of psyllids and their primary prokaryotic endosymbionts. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2898–2905.
- Thao, M. L., y Baumann, P. (2004) Evidence for multiple acquisition of *Arsenophonus* by whitefly species (Sternorrhyncha: Aleyrodidae) *Curr. Microbiol.* 48, 140–144.
- Toh, H., Weiss, B. L., Perkin, S. A., Yamashita, A., Oshima, K., Hattori, M. y Aksoy S., (2006) Massive genome erosion and functional adaptations provide insights into the symbiotic lifestyle of *Sodalis glossinidius* in the tsetse host. *Genome Res.* 16, 149–156.
- Tompkins, D., Forgie, S., Aislabie, J., Nugent, G., Gourlay H., McGill, A., McLeod, M., Yockney I., Paynter, Q., Fowler, S. y Hayes, L. (2012) Informing the infectious disease risks of dung beetle releases into New Zealand. *Landcare Research, New Zealand.*
- Torres-Manrique, C. (2012) La resistencia bacteriana a los antibióticos, siete décadas después de Fleming. Discurso leído. Academia de Farmacia, “Reino de Aragón”, Zaragoza.
- Turnbaugh, P.J., Backhed, F., Fulton, L. y Gordon, J.I. (2008) Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe* 3, 213–223.
- Turnbaugh, P.J., Hamady M., Yatsunencko, T., Cantarel, B.L., Duncan, A., Ley R.E. *et al.* (2009) A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 457, 480–484.

- Turnbaugh, P.J., Ley R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R. y Gordon, J.I. (2006) An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444, 1027–1031.
- Turnbaugh, P.J., Ridaura, V.K., Faith, J.J., Rey F.E., Knight, R., *et al.* (2009) The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci. Transl. Med.* 1, 6ra14.
- Tzipori, S., Hayes, J., Sims, L. y Withers, M (1984) *Enterococcus durans*: unexpected pathogen of foals. *J. Infect. Dis.* 150, 589–593.
- Vander Wall, S. B. y Longland, W. S. (2004) Diplochory: are two seed dispersers better than one?. *Trends Ecol. Evol.* 19, 155–161.
- Vasanthakumar, A., Delalibera, I., Handelsman, J., Klepzig, K.D., Schloss, P.D. y Raffa, K.F. (2006) Characterization of gut-associated bacteria in larvae and adults of the southern pine beetle, *Dendroctonus frontalis* Zimmermann. *Environ. Entomol.* 35, 1710–1717.
- Vázquez-Larios, A. L., Solorza-Feria, O., de G. González-Huerta, R., Ponce-Noyola, M. T., Barrera-Cortés, J., Rinderknecht-Seijas, N. y Poggi-Varaldo, H. M. (2013) Effect of Two Anodic Materials and RuxMoySez as a Cathode Catalyst on the Performance of Two Singlw Chamber Microbial Fuel Cells. *J. New Mat. Electroch. Sys.* 16, 257–262.
- Vendrell, D., Balcázar, J.L., Ruiz-Zarzuela, I., De Blas, I. y Gironés, O. (2006) *Lactococcus garvieae* in fish: a review. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 29, 177–198.
- Venter, J. C., Remington, K., Heidelberg, J. F., Halpern, A. L. y Rusch, D. (2004) Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science* 304, 66–74.
- Ventura, M., Turroni, F., Canchaya, C., Vaughan, E. E., O'Toole, P. W. y Sinderen, D. (2009) Microbial diversity in the human intestine and novel insights from metagenomics. *Front. Bioscience* 14, 3214–3863.
- Verdú J. R., Lobo, J. M., Numa, C., Pérez-Ramos, I., Galante, E. y Marañón, T. (2007) Acorn preference of the dung beetle, *Thorectes lusitanicus*, under laboratory and field conditions. *Anim. Behav.* 74, 1697–1704.
- Verdú, J. R. y Galante, E. (2004) Behavioural and morphological adaptations for a low-quality resource in semi-arid environments: dung beetles (Coleoptera,

- Scarabaeoidea) associated with the European rabbit (*Oryctolagus cuniculus* L.) J. Nat. Hist. 38, 705–715.
- Verdú, J. R., Casas, J. L., Lobo, J. M. y Numa, C. (2010) Dung beetles eat acorns to increase their ovarian development and thermal tolerance. PloS One 5, e10114.
- Viaud, S., Saccheri, F., Mignot, G., Yamazaki, T., Daillère, R., *et al.* (2013) The Intestinal Microbiota Modulates the Anticancer Immune Effects of Cyclophosphamide. Science 342, 971–976.
- Vieira, C. D. (2011) Count, identification and antimicrobial susceptibility of bacteria recovered from dental solid waste in Brazil. Waste Manage. 31, 1327–1332.
- Vignaroli, C., Zandri, G., Aquilanti, L., Pasquaroli, S. y Biavasco, F. (2011) Multidrug-Resistant *Enterococci* in animal meat and faeces and co-transfer of resistance from an *Enterococcus durans* to a human *Enterococcus faecium*. Curr. Microbiol. 62, 1438–1447.
- Vulinec, K. (2000) Dung Beetles (Coleoptera: Scarabaeidae), Monkeys, and Conservation in Amazonia. Florida Entomol. 83, 229–241.
- Waite, D. W., Deines, P. y Taylor, M. W. (2012) Gut microbiome of the critically endangered New Zealand parrot, the Kakapo (*Strigops habroptilus*) PloS One, 7, e35803.
- Waksman, S. A. y Woodruff, H. B. (1940) The soil as a source of microorganisms antagonistic to disease-producing bacteria. J. Bacteriol. 40, 581–600.
- Wang, M., Ahrne, S., Jeppsson, B. y Molin, G. (2005) Comparison of bacterial diversity along the human intestinal tract by direct cloning and sequencing of 16S *rRNA* genes. FEMS Microbiol. Ecol. 54, 219–231.
- Warnecke, F., Luginbuhl, P., Ivanova, N., Ghassemian, M., Richardson, T.H. *et al.* (2007) Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood–feeding higher termite. Nature 450, 560–565.
- Weber, F. J., Ooijkaas, L. P., Schemen, R. M. W., Hartmans, S. y de Bont, J. A. M. (1993) Adaptation of *Pseudomonas putida* S12 to high concentrations of styrene and other organic solvents. Appl. Environ. Microbiol. 59, 3502–3504.
- Wellcome Trust Case Control Consortium (2007) Genome-wide association study of 14,000 cases of seven common diseases and 3,000 shared controls. Nature 447, 661–678.

- Wen, L., Ley R. E., Volchkov, P. Y., Stranges, P. B., Avanesyan, L., *et al.* (2008) Innate immunity and intestinal microbiota in the development of type 1 diabetes. *Nature* 455, 1109–1113.
- Whitaker, J. O. Jr, Dannelly H. K., Prentice, D. A. (2004) Chitinase in insectivorous bats. *J. Mammal.*, 85: 15–8.
- Williams, C. M., Barker, J. C. y Sims, J. T. (1999) Management and utilization of poultry wastes. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 162, 105–157.
- Williams, M.G., Shirai, H., Shi, J., Nagendra, H.G., Mueller, J., Mizuguchi, K. *et al.* (2001) Homologue recognition by iterative alignment refinement and comparative modelling. *Proteins*, 92–97.
- Witte, W. (1998) Biomedicine: medical consequences of antibiotic use in agriculture. *Science* 279, 996–997.
- Woese, C. R. (1987) Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51, 221–271.
- Wu, G. D., Chen, J., Hoffmann, C., Bittinger, K., Chen, Y.Y., Keilbaugh, S.A., Bewtra, M., *et al.* (2011) Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* 334, 105–108.
- Xu, J., Liu, Q., Jing, H., Pang, B., Yang, J., Zhao, G., y Li, H. (2003) Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from dung beetles *Catharsius molossus*. *Microbiol. Immunol.* 47, 45–49.
- Yilmaz, L. S., Okten, H. E. y Noguera, D. R. (2006) Making all parts of the 16S *rRNA* of *Escherichia coli* accessible in situ to single DNA oligonucleotides. *App. Environ. Microbiol.* 72, 733–744.
- Yim, G., Wang, H. H. y Davies, J. (2006) The truth about antibiotics. *Int. J. Med. Microbiol.* 296, 163–170.
- Yoon, J-H, Kang, S-J, Lee, J-S y Oh, T-K (2006) *Brevundimonas terrae* sp. nov., isolated from an alkaline soil in Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56, 2915–2919.
- Zhang S., Yang, G., Wang, Y. y Hou, S. (2010) Abundance and community of snow bacteria from three glaciers in the Tibetan Plateau. *J. Environ. Sci.* 22, 1418–1424.
- Zhang, H. Y. y Jackson, T. A. (2008) Autoctonous bacterial flora indicated by PCR-DGGE of 16S *rRNA* gene fragments from the alimentary tract of *Costelytra zealandica* (Coleoptera: Scarabaeidae) *J. Appl. Microbiol.* 105, 1277–1285.

- Zinn, Y. L., Lal, R., Resck, D. (2005) Changes in soil organic carbon stocks under agriculture in Brazil. *Til. Res.* 84, 28–40.
- Zoetendal, E. G, Rajilic-Stojanovic, M. y de Vos, W. M (2008) High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota. *Gut* 57, 1605–1615.

INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

Phylum	Class	Order	Family	Genus	A_1	A_2	A_3	F_1	F_2	F_3
Acidobacteria	Acidobacteriia	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	<i>Edaphobacter</i>			0,3570			
				<i>Gp1</i>			0,0510			0,0248
				<i>Gp3</i>			0,0510			
	Acidobacteriia	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	<i>Granulicella</i>		0,0655	0,2040			0,0745
	Acidobacteriia	Acidobacteriales	Acidobacteriaceae	<i>Terriglobus</i>			0,1020			
			Unclassified	<i>Acidobacteria_Gp1</i>		0,0262	0,2550			
Actinobacteria	Actinobacteria	Acidimicrobiales	Iamiaceae	<i>Acidobacteria_Gp3</i>			0,1020			
				<i>Iamia</i>			0,1020			
				Unclassified					0,0092	
				<i>Actinobacteria</i>			0,0510		0,1803	0,0248
		Actinomycetales	Actinomycetaceae	<i>Actinomyces</i>		0,0131			0,0153	
				Actinomycetaceae					0,0061	
				<i>Brevibacterium</i>	0,0107				0,0061	0,0248
				<i>Cellulomonas</i>					0,0122	
				<i>Oerskovia</i>				0,0577		
				<i>Paraoerskovia</i>			0,1530			
				Cellulomonadaceae		0,0131	0,5609		0,0092	0,0248
			Corynebacteriaceae	<i>Corynebacterium</i>		0,0262			0,2078	0,3975
				Corynebacteriaceae					0,0397	0,0248
			Demequinaceae	<i>Demequina</i>					0,0336	
				Dermatophilaceae					0,0275	
			Geodermatophilaceae	<i>Modestobacter</i>		0,4849			0,5593	
				Geodermatophilaceae		0,0131			0,0795	
			Gordoniaceae	<i>Gordonia</i>						0,0994
				Microbacteriaceae		0,0262			0,0122	
			Microbacteriaceae	<i>Agreia</i>					0,0031	0,0248
				<i>Agrococcus</i>						
				<i>Amnibacterium</i>			0,0510			
				<i>Arthrobacter</i>				0,0144		0,0248
				<i>Clavibacter</i>						0,0248
				<i>Curtobacterium</i>		0,0131				
				<i>Fron dih abitans</i>						0,5714
				<i>Herbiconiux</i>			0,1530		0,0031	
				<i>Labeledella</i>			0,0510			
				<i>Leifsonia</i>						0,0248
				<i>Microbacterium</i>			0,1020	0,0144	0,0061	0,0497
				Microbacteriaceae	0,0107	0,4718	0,4589		1,0728	4,2236
				<i>Phycicola</i>						0,0248
				<i>Pseudoclavibacter</i>	0,0322	0,0524			0,1375	
				<i>Rathayibacter</i>		0,2883			0,3362	0,0248
				<i>Salinibacterium</i>					0,0306	
				<i>Schumannella</i>					0,0031	
				<i>Yonghaparkia</i>					0,0031	
			Micrococcaceae	<i>Kocuria</i>		0,0262				
				<i>Micrococcus</i>		0,0131			0,0214	
			Micromonosporaceae	Micrococcaceae			0,0510		0,0092	
				<i>Catellatospora</i>			0,1020			
				<i>Catelliglobospora</i>					0,0031	
				<i>Hamadaea</i>			0,0510			
				<i>Micromonospora</i>			0,2550			
				<i>Pseudosporangium</i>					0,0031	
				Micromonosporaceae		0,0131	0,4080		0,0183	0,0497
				<i>Mycobacterium</i>		0,0131				
Phylum	Class	Order	Family	Genus	A_1	A_2	A_3	F_1	F_2	F_3

Bacteroidetes	Bacteroidia	Bacteriodales	Nakamurellaceae	<i>Humicoccus</i>	0,0131	0,1530	0,0144					
				Nakamurellaceae	0,0262							
				Nocardioidaceae	<i>Aeromicrobium</i>					0,0703	0,0248	
					<i>Kribbella</i>	0,0655				0,1284		
					<i>Marmoricola</i>	0,7610	10,6146	0,4589	0,2021	39,9749	0,2236	
					<i>Pimelobacter</i>		0,0131	0,5609		0,0031	0,2236	
					<i>Rhodococcus</i>						0,0248	
					Nocardioidaceae	0,1179	1,4939	1,4278		5,1012	0,1242	
				Propionibacteriaceae	<i>Microlunatus</i>				0,0144			
					<i>Nocardioides</i>	0,1072	2,3064	1,7338		9,5666	0,0745	
					<i>Propionibacterium</i>	0,0107	0,0655			0,1528	0,5217	
				Pseudonocardiaceae	Pseudonocardiaceae	0,0107	0,1310			0,3607		
					<i>Saccharothrix</i>		0,0131			0,0183		
				Segniliparaceae	<i>Segniliparus</i>						0,0497	
				Streptomycetaceae	<i>Streptacidiphilus</i>			0,1530				
				Streptomycetaceae	<i>Streptomyces</i>			0,1020		0,0245		
				Unclassified	<i>Actinomycetales</i>	0,2465	2,7650	10,5048	0,1732	7,8061	0,9938	
				Unclassified	<i>Luteimicrobium</i>			0,1020				
				Bacteroidia	Bacteriodales	Bacteroidaceae	<i>Bacteroides</i>	0,0262		0,0144	0,0520	
						Prevotellaceae	<i>Prevotella</i>					0,0248
						Porphyromonadaceae	<i>Dysgonomonas</i>	0,1573			0,1100	0,2236
							<i>Paludibacter</i>	0,0131				
							<i>Parabacteroides</i>	0,1310			0,0031	0,0745
							<i>Petrimonas</i>	0,0131			0,0031	
							<i>Proteiniphilum</i>	0,0131				
						Rikenellaceae	<i>Alistipes</i>	0,0655			0,0183	0,0248
							<i>Rikenella</i>				0,0031	
		Cytophagia	Cytophagales			Cytophagaceae	<i>Dyadobacter</i>				0,2236	
							<i>Emticia</i>			0,0497		
							<i>Leadbetterella</i>			0,2484		
		Flavobacteriia	Flavobacteriales			Flavobacteriaceae	<i>Chryseobacterium</i>	0,0131				
						Cryomorphaceae	<i>Fluviicola</i>				0,0745	
		Sphingobacteriia	Sphingobacteriales			Chitinophagaceae	<i>Filimonas</i>				0,0092	0,8447
							<i>Sediminibacterium</i>				0,0497	
							<i>Terrimonas</i>		0,2550	0,0144		
							Sphingobacteriaceae	<i>Mucilagibacter</i>	0,3800	0,1020		0,0248
						<i>Pedobacter</i>				0,4720		
						<i>Sphingobacterium</i>			0,0031	0,8696		
				Unclassified	Bacteriodales	Unclassified	<i>Bacteroidales</i>	0,0655			0,0550	0,0745
						Unclassified	<i>Bacteroidetes</i>	0,0107	0,0131		0,1161	0,1739
						Unclassified	Chitinophagaceae				0,1011	0,0497
						Unclassified	Cyclobacteriaceae		0,0262			
						Unclassified	Flavobacteriaceae		0,0131		0,0031	0,0994
						Flavobacteriales	Unclassified		0,0131			
		Unclassified	Porphyromonadaceae				0,1048		0,0397	0,1739		
		Unclassified	Prevotellaceae				0,0131		0,0031			
		Unclassified	Rikenellaceae						0,0092			
		Unclassified	Sphingobacteriaceae							0,1242		
										739		
Deinococcus-Thermus	Deinococci	Thermales	Thermaceae	<i>Meiothermus</i>	0,0131							
	Deinococci	Thermales	Thermaceae	<i>Thermus</i>	0,0131			0,0031	0,2484			
	Deinococci	Thermales	Thermaceae	Thermaceae				0,0031				
Phylum	Class	Order	Family	Genus	A_1	A_2	A_3	F_1	F_2	F_3		

Firmicutes	Bacilli	Bacillales	Bacillaceae	<i>Bacillus</i>	0,0214	0,0131		0,6208	0,0275	
			Bacillaceae 1	Bacillaceae 1				0,1299		
			Bacillaceae 2	Bacillaceae 2				0,1155	0,0031	
			Bacillaceae	<i>Geobacillus</i>					0,0122	
			Bacillales Family XI	<i>Gemella</i>						0,0745
			Planococcaceae	Planococcaceae				0,0722	0,0245	
			Unclassified	<i>Bacillales</i>	0,0965	0,0524		5,5002	0,1437	0,1242
			Staphylococcaceae	<i>Macrococcus</i>						0,0248
			Staphylococcaceae	<i>Staphylococcus</i>	0,0107	0,1441		0,0144	0,3209	0,5466
			Staphylococcaceae	Staphylococcaceae	0,0214			0,0144	0,0153	0,0497
		Lactobacillales	Aerococcaceae	<i>Abiotrophia</i>					0,0122	
			Aerococcaceae	<i>Globicatella</i>	0,0322				0,2231	
			Aerococcaceae	Aerococcaceae					0,0183	
			Carnobacteriaceae	<i>Carnobacterium</i>		0,0786		2,2809	0,0092	0,1739
			Carnobacteriaceae	<i>Dolosigranulum</i>					0,0031	
			Carnobacteriaceae	<i>Granulicatella</i>					0,0092	0,0497
			Carnobacteriaceae	Carnobacteriaceae				0,1011		0,0248
			Enterococcaceae	<i>Enterococcus</i>	1,7363	2,8830		0,6641	0,0764	0,9441
			Enterococcaceae	<i>Melissococcus</i>				0,0289		0,0248
			Enterococcaceae	Enterococcaceae		0,2359		0,2021	0,0183	0,2981
			Enterococcaceae	<i>Vagococcus</i>		0,0131		0,0144		
			Lactobacillaceae	<i>Lactobacillus</i>					0,0336	0,1491
			Lactobacillaceae	Lactobacillaceae					0,0061	
			Lactobacillaceae	Lactobacillaceae					0,0061	
			Unclassified	Lactobacillales	0,0750	0,1179		0,2887	0,0336	0,0745
			Leuconostocaceae	<i>Weissella</i>						0,0248
			Streptococcaceae	<i>Lactococcus</i>		0,3407		0,8806	0,0061	
			Streptococcaceae	<i>Streptococcus</i>	0,0322	0,1179			0,1498	0,5963
			Unclassified	Lactobacillales	0,0750	0,1179		0,2887	0,0336	0,0745
		Unclassified	Unclassified	<i>Bacilli</i>	0,1286	0,1441	0,0510	0,4042	0,0520	0,1491
	Clostridia	Clostridiales	Clostridiaceae	<i>Clostridium sensu stricto</i>						0,3230
			Clostridiaceae	<i>Clostridium XI</i>						0,0994
			Clostridiaceae 1	<i>Clostridiaceae 1</i>				0,0144		0,1242
			Clostridiaceae	<i>Clostridium XIX</i>					0,0122	0,0745
			Clostridiales Family XI	<i>Anaerococcus</i>		0,0393			0,0367	
			Clostridiales Family XIII	<i>Anaerovorax</i>					0,0092	
			Clostridiales Family XI	<i>Parvimonas</i>						0,0248
			Lachnospiraceae	<i>Moryella</i>					0,0031	
			Lachnospiraceae	Lachnospiraceae					0,0428	0,0745
			Oscillospiraceae	<i>Oscillibacter</i>		0,0131				
			Peptococcaceae	<i>Dehalobacter</i>		0,0524				
			Peptococcaceae	<i>Desulfitobacterium</i>					0,0031	
			Peptostreptococcaceae	Peptostreptococcaceae						0,0248
			Ruminococcaceae	<i>Anaerofilum</i>					0,0031	
			Ruminococcaceae	<i>Ethanoligenens</i>					0,0031	0,0248
			Ruminococcaceae	<i>Faecalibacterium</i>				0,0144		
			Ruminococcaceae	<i>Sporobacter</i>					0,0031	
			Ruminococcaceae	<i>Subdoligranulum</i>	0,0107				0,0245	
										248
										248
			Unclassified	<i>Clostridia</i>				0,8229	0,0306	
			Unclassified	<i>Clostridiales</i>	0,0214	0,0655	0,0510	6,6551	0,0917	0,3478
			Unclassified	<i>Clostridiales_Incertae Sedis XI</i>					0,0031	
Phylum	Class	Order	Family	Genus	A_1	A_2	A_3	F_1	F_2	F_3

Proteobacteria	Erysipelotrichi	Erysipelotrichales	Erysipelotrichaceae	<i>Erysipelothrix</i>					0,0061	
			Erysipelotrichaceae	<i>Turicibacter</i>	0,0131	0,1020		0,3423	0,0248	
			Erysipelotrichaceae	Erysipelotrichaceae				0,0031		
	Negativicutes	Selenomonadales	Veillonellaceae	<i>Veillonella</i>				0,0031	0,0497	
	Unclassified Alphaproteobacteria	Unclassified	Unclassified	<i>Firmicutes</i>	0,4716	0,2490	0,0510	52,7068	0,4646	0,4224
		Caulobacteriales	Caulobacteraceae	<i>Asticcacaulis</i>			0,5609			
				<i>Brevundimonas</i>				0,0214	0,0994	
				<i>Caulobacter</i>		0,0262	0,0510			
				<i>Phenyllobacterium</i>		0,0262	0,1020		0,0520	
		Rhizobiales	Bartonellaceae	<i>Bartonella</i>					0,0031	
			Beijerinckiaceae	<i>Camellimonas</i>					0,0092	
				<i>Methylocapsa</i>			0,0510			
				<i>Methylovirgula</i>			0,0510			
			Bradyrhizobiaceae	<i>Afiplia</i>		0,0262	0,6119	0,0289	0,0061	0,0248
				<i>Agromonas</i>			0,1020			
				<i>Bosea</i>				0,0144	0,0245	
				<i>Bradyrhizobium</i>		0,0917	1,2239	0,1299		
				<i>Nitrobacter</i>		0,0262	0,1020	0,0144		
				<i>Oligotropha</i>				0,0289		
				<i>Rhodopseudomonas</i>			0,0510			
			Hyphomicrobiaceae	<i>Rhodoplares</i>			0,1020			
				<i>Devosia</i>				0,0289	0,0122	0,0994
				<i>Gemmiger</i>					0,0245	
			Methylocystaceae	<i>Methylocystis</i>			0,0510			
			Phyllobacteriaceae	<i>Aminobacter</i>					0,0031	
				<i>Mesorhizobium</i>			0,4080		0,0061	0,0248
			Rhizobiaceae	<i>Rhizobium</i>			0,3570			0,0497
				<i>Shinella</i>			0,1020	0,0289		0,0248
				<i>Sinorhizobium</i>			0,0510			
			Sinorhizobium	<i>Ensifer</i>			0,2550			
			Unclassified	<i>Vasilyevaia</i>		0,0131	0,0510		0,0061	
			Xanthomonadaceae	<i>Labrys</i>			0,2550			0,0497
		Rhodobacterales	Rhodobacteraceae	<i>Rhodobacter</i>					0,0092	0,0497
				<i>Stappia</i>						0,0248
		Rhodospirillales	Acetobacteraceae	<i>Acidisoma</i>		0,0524				
				<i>Acidisphaera</i>			0,0510			
				<i>Roseomonas</i>			0,0510			
			Rhodospirillaceae	<i>Azospirillum</i>					0,0092	
		Rickettsiales	Anaplasmataceae	<i>Anaplasma</i>		0,0131				
			Rickettsiaceae	<i>Rickettsia</i>				0,0144	0,0795	
		Sphingomonadales	Sphingomonadaceae	<i>Blastomonas</i>			0,0510		0,0122	
				<i>Navosphingobium</i>		0,1048	4,3855	0,0289		0,0497
			Sphingomonadaceae	<i>Sphingomonas</i>			0,7139	0,1444	0,0397	0,0994
				<i>Sphingopyxis</i>						0,4224
				<i>Porphyrobacter</i>			0,0510		0,0367	
Betaproteobacteria	Burkholderiales		Alcaginaceae	<i>Achromobacter</i>			0,3060	0,0144		
			Burkholderiaceae	<i>Burkholderia</i>		0,6945	6,5783	0,0144	0,0061	0,0745
			Burkholderiaceae	<i>Limnobacter</i>						0,0248
			Comamonadaceae	<i>Comamonas</i>						0,0745
			Comamonadaceae	<i>Delftia</i>					0,0031	
			Comamonadaceae	<i>Diaphorobacter</i>					0,0061	
Phylum	Class	Order	Family	Genus	A_1	A_2	A_3	F_1	F_2	F_3

Phylum	Class	Order	Comamonadaceae	<i>Pelomonas</i>				0,0144	0,0000	
			Comamonadaceae	<i>Ramlibacter</i>						0,0248
			Comamonadaceae	<i>Schlegella</i>	0,0131					
			Comamonadaceae	<i>Variovorax</i>		1,2749				0,0745
			Oxalobacteriaceae	<i>Herbaspirillum</i>		0,0510				
			Oxalobacteriaceae	<i>Hermiimonas</i>						0,0745
			Oxalobacteriaceae	<i>Massilia</i>	0,0107				0,0825	0,0994
			Oxalobacteriaceae	<i>Telluria</i>					0,0031	
			Oxalobacteriaceae	<i>Undibacterium</i>						0,0248
			Unclassified	<i>Tepidimonas</i>						0,0248
		Hydrogenophiales	Hydrogenophilaceae	<i>Hydrogenophilus</i>	0,0262					0,1491
		Neisseriales	Neisseriaceae	<i>Neisseria</i>					0,0061	0,0248
			Neisseriaceae	<i>Silvimonas</i>		0,1020				
		Nitrosomonadales	Nitrosomonadaceae	<i>Nitrosospira</i>		0,0510				0,0248
		Rhodocyclales	Rhodocyclaceae	<i>Zoogloea</i>	0,0131					
		Unclassified	Unclassified	<i>Methylibium</i>		0,1530				
	Deltaproteobacteria	Desulfarculales	Desulfarculaceae	<i>Desulfarculus</i>	0,0131					
		Desulfovibrionales	Desulfovibrionaceae	<i>Desulfovibrio</i>	0,0131					
	Gammaproteobacteria	Myxococcales	Cystobacteriaceae	<i>Hyalangium</i>		0,0510				
		Aeromonadales	Aeromonadaceae	<i>Aeromonas</i>	0,0131				0,0061	
	Enterobacteriales	Enterobacteriaceae	<i>Blastotricha</i>	<i>Blastotricha</i>	0,0262				0,0031	
				<i>Brenneria</i>		0,1020				
				<i>Buttiauxella</i>	0,0655	0,2550	0,1299			0,8696
				<i>Citrobacter</i>	0,0786	0,2040		0,0183		4,7702
				<i>Cronobacter</i>	0,0643					0,0248
				<i>Dickeya</i>		0,0131				
				<i>Enterobacter</i>	0,0214	3,3416	0,5099	1,7901	0,0031	5,0683
				<i>Erwinia</i>	0,2894	0,6159	1,5808		0,0367	0,2236
				<i>Escherichia/Shigella</i>	0,0214	0,0262			0,0611	0,0497
				<i>Gibbsiella</i>		0,1048		0,0144		
				<i>Hafnia</i>	0,0107	0,0262	0,1020	0,1155	0,0031	0,0497
				<i>Klebsiella</i>	0,2251	0,5373	0,1020	0,0433		0,5963
				<i>Kluyvera</i>	1,4041	0,5504	0,2040	0,0577	0,0122	0,4224
				<i>Leclercia</i>				0,0144	0,0031	
				<i>Mangrovibacter</i>	0,0107					
				<i>Morganella</i>						0,0248
				<i>Pantoea</i>				0,0144		
				<i>Pectobacterium</i>		0,0262		0,0144		
				<i>Pragia</i>	0,0107			0,0433		
				<i>Providencia</i>		0,0262	0,0510		0,0214	15,9503
				<i>Rahnella</i>					0,0031	
				<i>Raoultella</i>	43,7513	37,0856	12,8506	0,7218	0,1498	3,9752
				<i>Salmonella</i>	0,1501	0,0786			0,0092	0,0497
				<i>Serratia</i>	0,4930	1,7822	0,9179	2,1366	0,0031	4,8199
				<i>Sodalis</i>	0,0107					
				<i>Tatumella</i>	0,0107			0,0144		
				<i>Xenorhabdus</i>				0,0144		
				<i>Yersinia</i>	1,2612	2,0826	1,2350	0,4475		1,1925
										248
Phylum	Class	Order	Legionellaceae	<i>Legionella</i>					0,0092	
		Oceanospirillales	Oceanospirillaceae	<i>Marinomonas</i>	0,0131					
		Pasteurellales	Pasteurellaceae	<i>Aggregatibacter</i>	0,0131					
Phylum	Class	Order	Family	Genus	A_1	A_2	A_3	F_1	F_2	F_3

			<i>Bibersteinia</i>						0,0031	
			<i>Haemophilus</i>	0,0107	0,0131				0,0122	
			<i>Pasteurella</i>		0,0262				0,0031	
			<i>Phocoenobacter</i>						0,0031	
	Pseudomadales	Moraxallaceae	<i>Acinetobacter</i>	0,0107	0,0393				0,0336	0,2236
			<i>Alkanindiges</i>		0,0786	0,1530				0,0248
			<i>Enhydrobacter</i>		0,0131				0,0092	0,2733
			<i>Perlucidibaca</i>				0,0144			
		Pseudomonadaceae	<i>Azomonas</i>		0,0131					
			<i>Azotobacter</i>						0,0061	
			<i>Pseudomonas</i>	0,3966	2,6471	0,1530	0,0577	0,5135	4,8944	
			<i>Serpens</i>						0,0061	
	Unclassified	Unclassified	<i>Sedimenticola</i>					0,0144		
	Xanthomonadales	Xanthomonadaceae	<i>Dyella</i>		0,1310	3,4676	0,0144	0,0031	0,0497	
			<i>Frateuria</i>	0,0107	0,0131	0,0510				0,0248
			<i>Luteibacter</i>		0,2097	0,6629				
			<i>Luteimonas</i>							0,0248
			<i>Lysobacter</i>							0,0248
			<i>Pseudoxanthomonas</i>						0,0428	0,4969
			<i>Rhodanobacter</i>		0,1179	0,5099		0,0031		
			<i>Rudaea</i>			0,0510				
			<i>Stenotrophomonas</i>		0,0131			0,0214	0,2981	
			<i>Xanthomonas</i>					0,0031	0,0248	
Unclassified	Burkholderiales	Unclassified	Burkholderiales		0,1441	2,0398		0,0153		
	Burkholderiales	Unclassified	Burkholderiales_incertae_sedis		0,0131	0,1020		0,0031		
	Oceanospirillales	Unclassified	Oceanospirillales					0,0031	0,0248	
	Rhizobiales	Unclassified	<i>Rhizobiales</i>		0,0262	1,6318	0,0144	0,0367	0,1988	
	Sphingomonadales	Unclassified	Sphingomonadales			0,2040			0,0497	
	Sphingomonadales	Unclassified	Xanthomonadaceae	0,0107	0,1835	1,0709		0,0336	0,0994	
	Unclassified	Acetobacteraceae	Acetobacteraceae			0,1530			0,0248	
		Alcaligenaceae	Alcaligenaceae			0,2040				
		Anaplasmataceae	Anaplasmataceae						0,0031	
		Beijerinckiaceae	Beijerinckiaceae			0,1020				
		Bradyrhizobiaceae	Bradyrhizobiaceae		0,0131	0,6629	0,0577	0,0183		
		Burkholderiaceae	Burkholderiaceae		0,0262	0,1020				
		Chromatiaceae	Chromatiaceae						0,0031	
		Comamonadaceae	Comamonadaceae			0,4080	0,0289		0,1491	
		Deltaproteobacteria	Deltaproteobacteria		0,0655	0,1020		0,0458	0,0497	
		Desulfobacteraceae	Desulfobacteraceae	0,0107	0,0262			0,0092		
		Desulfovibrionaceae	Desulfovibrionaceae						0,0248	
		Enterobacteriaceae	Enterobacteriaceae	18,5531	20,0367	11,7797	6,7995	0,3484	21,7888	
		Erythrobacteraceae	Erythrobacteraceae					0,0092		
		Methylococcaceae	Methylococcaceae					0,0031		
		Moraxellaceae	Moraxellaceae					0,0092	0,0745	
		Neisseriaceae	Neisseriaceae					0,0061		
		Oceanospirillaceae	Oceanospirillaceae					0,0031		
		Oxalobacteraceae	Oxalobacteraceae					0,0245	0,0248	
		<i>Pasteurellaceae</i>	<i>Pasteurellaceae</i>					0,0007		
										248
		Pseudomonadaceae	Pseudomonadaceae	0,0107	0,1310		0,0144	0,0550	0,5217	
		Rhizobiaceae	Rhizobiaceae			0,8159				
		Rhodobacteraceae	Rhodobacteraceae				0,0144	0,0489	0,0745	
Phylum	Class	Order	Family	Genus	A_1	A_2	A_3	F_1	F_2	F_3

			Rickettsiaceae	Rickettsiaceae					0,0031	
			Sphingomonadaceae	Sphingomonadaceae	0,0107		0,4589	0,0722	0,0245	0,0745
			Unclassified	Alphaproteobacteria		0,0786	0,7649	0,0433	0,1161	0,0745
				Betaproteobacteria		0,0393	0,3570	0,0144	0,0153	0,0497
				Gammaproteobacteria	0,4930	0,5111	2,2438	0,3320	0,2476	2,0373
				<i>Parapusillimonas</i>					0,0031	
				Proteobacteria	0,1929	0,2752	2,9067	0,5341	2,1150	1,6398
				Pseudomonadales		0,0131	0,1020		0,0092	0,2236
				<i>Rhizomicrobium</i>			0,0510			
				<i>Shimwellia</i>		0,0131				
Synergistetes	Synergistia	Synergistales	Synergistaceae	<i>Thermanaerovibrio</i>					0,0031	
Tenericutes	Mollicutes	Anaeroplasmatales	Anaeroplasmateceae	<i>Anaeroplasma</i>					0,0031	
		Entomoplasmatales	Spiroplasmataceae	<i>Spiroplasma</i>	26,1951	0,0524		0,2021	0,0183	0,0248
		Entomoplasmatales	Unclassified	Entomoplasmatales	0,0322			0,0577		
	Unclassified	Unclassified	Unclassified	Mollicutes	0,3215			0,0289		
				TM7_genera_incertae_sedis	0,0429	0,288298	5,1504	0,0144	3,4813	0,4472
Verrucomicrobia	Verrucomicrobiae	Verrucomicrobiales	Verrucomicrobiaceae	<i>Luteolibacter</i>					0,0092	

